

2711.3018.4

Université de Montréal

Marqueurs de risque cardiovasculaire et Intima-media carotidienne chez les patients  
diabétiques de type 2

Par

Nadiah Moussavi

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Nutrition

Février 2003

Nadiah Moussavi, 2003





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

"Marqueurs de risque cardiovasculaire et Intima-media carotidienne chez les patients  
diabétiques de type 2"

présenté par:

Nadiah Moussavi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dre. Michèle Houde-Nadeau, Président-rapporteur

Dr. Omar Serri, Directeur de thèse

Dre. Geneviève Renier, Co-Directrice de thèse

Dr. Emile Levy, membre de jury

Mémoire accepté, le:

## SOMMAIRE

Les patients diabétiques de type 2, ont un risque accru de deux à quatre fois comparativement aux sujets non diabétiques de développer des maladies cardiovasculaires (MCV). Les facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels tels l'hypertension, la dyslipidémie, l'âge, le tabagisme et l'hyperglycémie expliquent seulement partiellement cette augmentation. Récemment de nouveaux facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques de la vasculopathie diabétique, tels la dysfonction endothéliale, l'inflammation systémique et le stress oxydatif, ont été identifiés. Ainsi, il a été démontré que divers marqueurs de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de stress oxydatif étaient étroitement associés ou même prédisaient le risque de MCV chez le sujet diabétique. Cependant, les relations qui existent, d'une part entre ces marqueurs en tant que tels et d'autre part entre ces marqueurs et les facteurs de risque conventionnels des MCV associées au diabète sont encore mal connues.

Dans notre étude, nous avons mesuré chez 25 sujets sains et 40 patients diabétiques de type 2 sans complications macro-vasculaires et bien contrôlés pour la tension artérielle et la cholestérolémie, les niveaux plasmatiques de diverses molécules d'adhésion endothéliale à savoir la E-sélectine (ELAM-1), la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1), ainsi que les niveaux plasmatiques de 8-isoprostane et de protéine C-réactive (CRP). Nous avons aussi déterminé par ultrasonographie l'épaisseur de l'intima-media (IMT) de l'artère carotidienne chez ces sujets. Nous avons enfin

cherché à établir les relations existant entre ces marqueurs plasmatiques de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de stress oxydatif, l'IMT et les paramètres cliniques et biochimiques de nos groupes témoins et diabétiques.

Nos résultats ont démontré que les valeurs moyennes de E-sélectine, ICAM-1, CRP et de 8-isoprostane étaient plus élevées chez les patients diabétiques que chez les sujets sains alors que les mesures d'IMT étaient identiques dans les deux groupes. Les analyses multivariées ont montré que le contrôle glycémique était prédictif de E-sélectine, tandis que l'obésité abdominale était prédictive de ICAM-1 et de CRP. Nous avons enfin démontré une corrélation entre tension artérielle et niveaux sériques de 8-isoprostane.

En conclusion, nos résultats démontrent une élévation des niveaux circulants de divers marqueurs sériques de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de stress oxydatif et ce sans altération de l'IMT chez des patients diabétiques de type 2 ne présentant pas d'évidence clinique de complications macro-vasculaires. Ces données suggèrent que l'élévation de ces marqueurs périphériques puisse précéder chez certains sujets diabétiques celle de l'IMT. Vu le rôle de l'hypertension artérielle et de l'hypercholestérolémie comme déterminants majeurs de l'IMT, cette conclusion pourrait particulièrement s'appliquer aux sujets diabétiques démontrant un bon contrôle de la tension artérielle et des niveaux plasmatiques de cholestérol.

## TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
Composition du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi

### **I. INTRODUCTION**

1.0 Introduction générale.....	2
--------------------------------	---

### **II. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

1.0 Diabète sucré.....	5
1.1 Définition.....	5
1.2 Diabète de type 2.....	5
1.2.1 Prévalence .....	5
1.2.2 Épidémiologie.....	6
1.2.2.1 Les facteurs de risque génétiques.....	6
1.2.2.2 Les facteurs de risque environnementaux...	7
1.2.2.3 Interaction entre facteurs génétiques/ environnementaux.....	9
1.3 Les complications vasculaires du diabète.....	10
1.3.1 Microvasculaires.....	10

1.3.2 Macrovasculaires.....	12
<b>2.0 Athérosclérose.....</b>	<b>12</b>
<b>3.0 Épaisseur de l'intima-media carotidienne.....</b>	<b>16</b>
<b>4.0 Facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose associée au diabète de type 2.....</b>	<b>17</b>
4.1 Facteurs de risque conventionnels.....	17
4.1.1 Hyperglycémie.....	17
4.1.2 Dyslipidémie.....	22
4.1.3 Hypertension.....	23
4.1.4 Tabagisme.....	23
4.1.5 Obésité.....	23
4.1.6 Âge.....	24
4.1.7 Sexe.....	24
4.2 Nouveaux facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques.....	24
4.2.1 Dysfonction endothéliale.....	24
4.2.2 Altération de la coagulation.....	25
4.2.3 Stress oxydatif .....	26
4.2.4 Inflammation systémique.....	26



### **III. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE**

**1.0 Problématique.....30**

**2.0 Objectifs.....30**

**3.0 Article.....31**

« LACK OF CONCORDANCE BETWEEN PLASMA MARKERS  
OF CARDIOVASCULAR RISK AND INTIMA-MEDIA  
THICKNESS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES »

### **IV. DISCUSSION**

**Discussion.....61**

### **V. BIBLIOGRAPHIE**

**Bibliographie.....72**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	:Enzyme de conversion de l'angiotensine
AGE	:Produits terminaux de glycation, "advanced glycation end products"
AR	:Aldose réductase
CRP	:Protéine C-réactive, "C-reactive protein"
DAG	:Diacylglycerol
ELAM-1	:E-sélectine, "E-selectine"
sELAM-1	:E-sélectine soluble
HDL	:Lipoprotéines de haute densité, "high-density lipoproteins"
HRT	:Hormonothérapie
ICAM-1	:Molécule d'adhésion intercellulaire-1, "Intercellular Cell Adhesion Molecule-1"
sICAM-1	:Molécule d'adhésion intercellulaire-1 soluble
IGF-1	:Facteur de croissance ressemblant à l'insuline-1, "insulin-like growth factor-1"
IMC	:Indice de masse corporelle
IMT	:Épaisseur de l'intima media, "intima-media thickness"
LDL-cholestérol	:Lipoprotéines de faible densité, "low-density lipoproteins"
LO	:Lipoxygénase
MCV	:Maladies cardiovasculaires
NO	:Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote, "nitric oxide"
PAI-1	:Inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène, "plasminogen

	activator inhibitor-1"
PDGF	:Facteur de croissance dérivé des plaquettes, "platelet-derived growth factor"
PKC	:Protéine kinase C
PPAR gamma	: "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma"
ROS	:Espèces réactives oxygénées
SDH	:Sorbitol déshydrogénase
TBARS	: "Thiobarbituric acid reactive substances"
tPA	:Activateur tissulaire du plasminogène, "tissue-type plasminogen activator"
VCAM-1	:Molécule d'adhésion vasculaire-1, "Vascular Cell Adhesion Molecule-1"
sVCAM-1	:Molécule d'adhésion vasculaire-1 soluble
vWF	:Facteur von Willebrand
8-isoprostane	: "8-epi-prostaglandin F2 isoprostane"

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr Omar Serri pour avoir accepté de diriger ma maîtrise, et je lui suis reconnaissante pour ses conseils pertinents.

Je remercie, également Dr Geneviève Renier, qui m'a accueilli au sein de son équipe, a supervisé et co-dirigé ce travail. Je remercie les membres du laboratoire, et Dr Jean-Claude Mamputu pour m'avoir expliqué les techniques de laboratoire.

Toute ma gratitude est pour les co-auteurs, Chantal Riel, Johanne Auclair et tous les volontaires ainsi que les patients pour leur participation à la réalisation de ce travail.

Finalement, je remercie ma famille et plus particulièrement ma mère et ma sœur Wafa ainsi que tous mes amis (es) pour leur support et conseils tout au long de ce projet.

## **I. INTRODUCTION**

## 1.0 Introduction générale

Le diabète de type 2 est un problème de santé majeur à travers le monde, dont la prévalence augmente de manière épidémique dans les pays industrialisés et en voie de développement. À titre d'exemple, aux États-Unis près de 35 millions de personnes, soit 20% de la population d'âge moyen, et 35% de la population d'âge avancé, souffrent d'intolérance au glucose (Grundy et al, 2002). Les sujets diabétiques de type 2 ont un risque accru de deux à quatre fois de développer des maladies cardiovasculaires (MCV) comparé au reste de la population (Steven et al, 1998). La prévalence, l'incidence et la mortalité causées par les MCV est de deux à huit fois plus élevées chez les sujets diabétiques comparé aux sujets non diabétiques. La prévalence du diabète de type 2 est tout particulièrement en hausse chez les enfants et les adolescents, ce qui suggère dans le futur un développement prématuré de MCV dans ces groupes de population (Grundy et al, 2002).

Divers facteurs de risque conventionnels tels le sédentarisme, l'obésité, l'hypertension, la dyslipidémie, l'âge, le tabagisme, le sexe et l'hyperglycémie prédisent, en partie, le développement des MCV chez les patients diabétiques. Récemment, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la vasculopathie a permis l'identification de nouveaux marqueurs de risque cardiovasculaire. Cependant, les relations qui existent, d'une part entre ces marqueurs eux-mêmes et d'autre part entre ces marqueurs et les facteurs de risque conventionnels de l'athérosclérose sont mal connus.

Dans ce mémoire, nous présentons un article traitant des marqueurs sériques de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de stress oxydatif chez les patients diabétiques de type 2 sans complications macrovasculaires et de la relation existante entre ces divers marqueurs, l'épaisseur de l'intima-media au niveau carotidien et divers paramètres cliniques et biochimiques. Cet article sera précédé d'une revue de littérature sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la vasculopathie diabétique ainsi que sur les marqueurs systémiques qui leur sont associés. Une courte discussion suivra et portera sur les points saillants de notre travail.

## **II. REVUE DE LA LITTÉRATURE**



## **1.0 Diabète sucré**

### **1.1 Définition**

Selon l'OMS, le diabète sucré est une affection métabolique d'étiologie multiple, caractérisée par une hyperglycémie chronique et un désordre du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Le diabète est causé par un déficit de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline (Report of who consultation, 1999). Notre revue de littérature portera exclusivement sur le diabète de type 2.

### **1.2 Diabète de type 2**

Le diabète de type 2 se caractérise par une production hépatique excessive de glucose, un déficit de la sécrétion d'insuline et une résistance à l'insuline (De Fronzo, 1997). La résistance à l'insuline précède le plus souvent le diabète de plusieurs années. Elle est multifactorielle avec une composante génétique (Reaven, 2000). La résistance à l'insuline est aussi causée par des facteurs environnementaux tels, l'obésité, la sédentarité et la graisse. Au début, la résistance à l'insuline est compensée par l'hyperinsulinémie préservant une tolérance normale au glucose. L'intolérance au glucose survient lorsque la sécrétion d'insuline se réduit pour conduire ultérieurement à l'apparition du diabète de type 2.

#### **1.2.1 La prévalence du diabète de type 2**

Au cours des dernières décennies, le diabète de type 2 a pris des proportions épidémiques en raison du vieillissement de la population et de la prévalence galopante de l'obésité et du sédentarisme à travers le monde. On estime qu'il y aura une augmentation de 35% du nombre de patients diabétiques dans les pays

industrialisés entre 1995 et 2025 et que cette augmentation atteindra même 48% dans les pays en voie de développement (King et al, 1998).

### 1.2.2 Épidémiologie

Le diabète est une maladie qui résulte de facteurs génétiques et/ou environnementaux (Iacoviello et al, 2002).

#### 1.2.2.1 Les facteurs génétiques

Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans le développement du diabète de type 2. Leur rôle a été mis en évidence par des études de prévalence du diabète chez les jumeaux identiques ainsi que dans certaines familles et ethnies. Diverses mutations de gènes impliqués dans la sécrétion de l'insuline ou de la pro-insuline ou encore du récepteur de l'insuline ont été identifiées (Guillausseau et Lubetzki, 1996). A ce propos, une composante génétique du syndrome d'insulinorésistance semble clairement établie.

Des associations familiales de diabète de type 2 et de maladies coronariennes suggèrent en outre que des facteurs génétiques puissent jouer un rôle déterminant dans l'expression de la maladie athérosclérotique chez les sujets diabétiques de type 2. Ainsi une prévalence accrue de MCV a été démontrée dans certaines ethnies (Iacoviello et al, 2002), ainsi que chez les sujets ayant un diabète de type 2 familial (Krolewski et al, 1981). Il a été proposé que chez les sujets diabétiques de type 2, des altérations génétiques prédisposant aux MCV puissent précéder le développement du diabète et que leurs effets puissent être amplifiés par la présence d'altérations

métaboliques associées au diabète. Parmi les gènes candidats liant le diabète de type 2 à la maladie athérosclérotique, on note des gènes reliés à l'insulinorésistance, l'inflammation, le métabolisme lipidique, l'oxydation des lipoprotéines, la glycation des protéines et au système de coagulation (Mitchell et al, 2002). Des polymorphismes dans des gènes codant pour le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF alpha), le facteur de croissance ressemblant à l'insuline-1 (IGF-1), les adipocytokines et les « peroxisome proliferator-activated receptor gamma » (PPAR gamma) pourraient aussi être impliqués (Krentz et al, 2002).

#### 1.2.2.2 Les facteurs de risque environnementaux

Les facteurs de risque environnementaux du diabète de type 2 les plus rapportés dans la littérature sont la sédentarité, l'obésité et une diète mal équilibrée (Grundy et al, 2002).

##### - Diète et sédentarité

Une diète riche en glucides et en lipides et plus particulièrement en acides gras saturés, un apport faible en fibres alimentaires et en antioxydants combinés à un mode de vie sédentaire augmentent le risque de développement du diabète de type 2. L'activité physique, au contraire, augmente la sensibilité à l'insuline et améliore le métabolisme lipidique (Hill et Melanson, 1999).

##### - Âge

L'incidence du diabète de type 2 augmente avec l'âge. Ce dernier apparaît dans la majorité des cas, après 40 ans, et sa fréquence augmente au cours des années

(Grundy et al, 2002). Ce fait peut s'expliquer par l'acquisition de mauvaises habitudes alimentaires et un style de vie malsain (manque d'exercices physiques) ainsi que par le processus normal de vieillissement.

#### - Obésité

L'obésité, définie par un indice de masse corporelle (IMC), (rapport du poids en kilogrammes sur la taille en mètre au carré) supérieur à  $30\text{kg/m}^2$ , et plus particulièrement l'obésité abdominale augmentent le risque de diabète type 2 en induisant une résistance à l'insuline (Grundy et al, 2002). La forte prévalence d'obésité chez les patients diabétiques de type 2 souligne l'importance majeure de cette condition comme facteur de risque du diabète.

#### -Adiposité abdominale

Une distribution prédominante de graisse au niveau abdominal constitue un autre facteur important de risque de développer le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline. Ce type androïde d'obésité est différent de type "gynoïde" qui n'est pas associé avec la résistance à l'insuline (Chan et al, 1994; Abate et al, 1995). L'obésité abdominale, en plus d'être associée au diabète de type 2, est associée à une tension artérielle élevée, une hypertriglycémie, une augmentation des niveaux de lipoprotéines de faible densité (LDL) et une diminution des concentrations de lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques (Mekki et al, 1999), qui tous constituent des facteurs de risque de maladies coronariennes.

### - L'origine ethnique

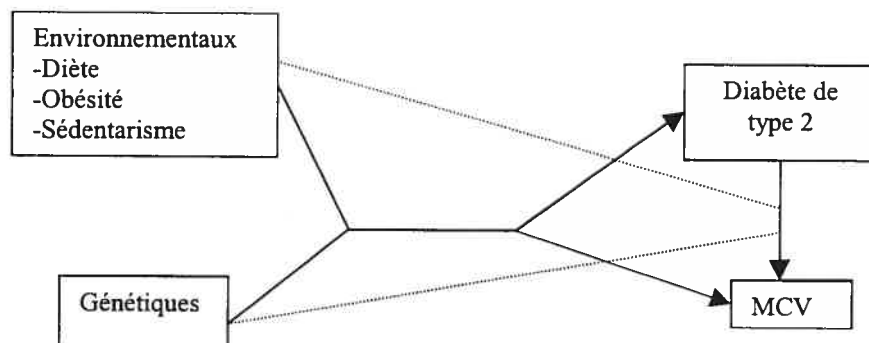
Certaines populations telles les autochtones, les personnes de race noire, les latino-américains et les asiatiques ont un risque accru de développer le diabète de type 2 comparativement aux caucasiens (Iacoviello et al, 2002). Ceci suggère l'implication de facteurs génétiques dans le développement du diabète de type 2.

#### 1.2.2.3 Interaction entre facteurs génétiques/environnementaux

La susceptibilité génétique au diabète de type 2 semble être influencée fortement par la présence de facteurs environnementaux. En effet, la prévalence élevée de diabète de type 2 dans les populations à travers le monde reflète le changement rapide de leur mode de vie, sédentarisme, diète et obésité. Cette interaction entre facteurs environnementaux et génétiques joue également un rôle déterminant dans le développement des MCV associées au diabète de type 2. Il est actuellement postulé que des facteurs environnementaux et génétiques communs soient responsables du développement du diabète de type 2 et des MCV.

Schéma 1

Facteurs environnementaux et génétiques communs au diabète de type 2 et aux MCV



### 1.3 Les complications vasculaires du diabète

Les diabétiques développent au cours des années des complications micro- et macro-vasculaires. Ces complications touchent la rétine, les reins, les nerfs et le système cardiovasculaire.

#### 1.3.1 Complications micro-vasculaires

Ces complications sont principalement la néphropathie, la neuropathie et la rétinopathie (Nathan, 1993). Une étude a démontré qu'un contrôle adéquat de la glycémie résulte en une diminution importante du développement et de la progression des complications micro-vasculaires (UKPDS, 2000).

##### -Néphropathie

Le diabète est la première cause d'insuffisance rénale chronique (US Renal Data System, 1998). Le taux de mortalité est de 20 à 40 fois plus élevé chez les diabétiques avec néphropathie que chez les diabétiques exemptes de cette pathologie (Hirano 1999). La néphropathie diabétique à ses débuts se caractérise par la présence d'une microalbuminurie (albuminurie entre 30 et 300mg par 24 heures). Sa progression vers l'insuffisance rénale terminale est associée à une protéinurie persistante et une hypertension artérielle (Trevisan et Viberti, 1996). L'hyperglycémie agit sur la progression de la néphropathie diabétique par divers mécanismes comme la formation des produits glyqués terminaux (AGE) et l'accumulation de sorbitol dans les glomérules et les tubules rénaux. Le glucose exerce aussi un effet néphrotoxique direct (Trevisan et Viberti, 1996).

### - Neuropathie

La neuropathie diabétique consiste en l'atteinte des nerfs périphériques des extrémités supérieures et inférieures (Nathan, 1993). Elle peut être de type sensitif et/ou motrice et entraîne des risques de traumatisme et d'amputation. Une autre forme de neuropathie peut aussi toucher le système autonome. La prévalence de la neuropathie dans le diabète augmente avec la durée de la maladie. L'hyperglycémie explique, en grande partie, le développement de la neuropathie chez les diabétiques par un mécanisme impliquant l'activation de la voie des polyols (Nakamura et al, 1998).

### - Rétinopathie

Quatre-vingt pourcent des diabétiques de type 2 ont un certain degré de rétinopathie et 20% d'entre eux présentent une rétinopathie de type prolifératif (Klein et Klein, 1995). L'hyperglycémie, en agissant par des mécanismes impliquant la voie des polyols, les produits terminaux de glycation (AGE), le stress oxydatif, la voie de la protéine kinase C (PKC) et certains facteurs de croissance joue un rôle clé dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. La rétinopathie diabétique évolue selon divers stades. À ces débuts, elle se caractérise par une perméabilité vasculaire accrue avec œdème rétinien, des micro-anévrismes et des hémorragies ponctuelles. La phase proliférative qui lui succède se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux dans la rétine et par la présence d'hémorragies; la rétinopathie diabétique peut causer un décollement rétinien et la cécité (Nathan, 1993).

### 1.3.2 Les complications macro-vasculaires

Les patients diabétiques ont un risque accru, de 2 à 4 fois, de développer des MCV (Steven et al, 1998). Des études ont rapporté que le diabète de type 2 affecte les artères de moyen et gros calibre. La macroangiopathie diabétique est attribuable à une accélération du processus athéromateux (Iacoviello et al, 2002).

## 2.0 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui se caractérise par l'accumulation de lipides, des cellules musculaires lisses et d'éléments fibreux dans la paroi artérielle. À son stade avancé, elle mène à la formation de thrombus responsable du développement de la symptomatologie clinique (Aldons , 2000). L'athérosclérose se développe en 3 stades : la strie lipidique ou lésion initiale, la lésion fibro-lipidique ou lésion avancée et la lésion compliquée.

### - Les stades de l'athérosclérose

La première étape de la formation d'une lésion athérosclérotique consiste en la pénétration et l'accumulation de LDL-cholestérol dans l'espace sous-endothélial. Il semble qu'outre les LDL, d'autres lipoprotéines puissent aussi s'accumuler dans l'intima et promouvoir l'athérosclérose (Aldons, 2000). Alors que les LDL natives sont peu captées par les macrophages, les LDL modifiées par des processus d'oxydation, de glycation ou d'agrégation contribuent à l'inflammation et à la formation de cellules spumeuses (Steinberg , 1997).



Cette étape se caractérise aussi par le recrutement des monocytes circulants dans l'espace sous-endothélial. Ces monocytes se transforment en macrophages puis ultérieurement, dans la paroi vasculaire, en cellules spumeuses. L'adhésion des monocytes circulants à l'endothélium et l'infiltration des LDL dans l'espace sous endothélial traduisent un état d'activation et de dysfonction endothéliale, puisqu'un endothélium normal a la capacité d'inhiber ces processus.

L'altération de la fonction endothéliale précède le développement de la lésion athéromateuse et contribue à son développement (Aldons, 2000). Les facteurs causaux de la dysfonction endothéliale incluent les LDL oxydées, le stress oxydatif, l'hypertension artérielle, l'hyperhomocystéinémie, certains agents infectieux, le tabagisme et le diabète (Ross, 1999). Les fonctions des cellules endothéliales contribuent principalement à l'homéostasie vasculaire. Ces fonctions sont a) le maintien du tonus vasculaire par la sécrétion de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices, b) le maintien et la formation de la matrice du tissu conjonctif (membrane basale et collagène), c) le contrôle de la perméabilité vasculaire aux nutriments, aux hormones ainsi qu'à diverses macromolécules, d) l'équilibre entre la production de facteurs pro-coagulants et anti-thrombotiques et e) la sécrétion de cytokines (TNF-alpha, interleukine-1) et de facteurs de croissance tels le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Shimokawa et al, 1999; Ross 1995).

Afin de remplir ces fonctions l'endothélium produit divers médiateurs tels le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline, les prostanoides, l'angiotensine-II, l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1), l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), le facteur von Willebrand (vWF), les cytokines et les molécules

d'adhésion exprimées à sa surface (Stehouwer et al, 1996). Les molécules d'adhésion exprimées à la surface d'un endothélium activé, sont les médiateurs du processus d'adhésion des monocytes à l'endothélium (Pigott et al, 1992). Ces molécules sont la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1), et la E-sélectine (ELAM-1). Alors que ICAM-1 et VCAM-1 sont exprimées à la surface des diverses cellules vasculaires telles les cellules endothéliales, les fibroblastes, les leucocytes et les cellules épithéliales, ELAM-1 est exprimée uniquement par les cellules endothéliales.

L'altération de la fonction endothéliale est la première phase de l'athérosclérose. La lésion peut ensuite progresser vers une deuxième stade appelée la lésion fibro-lipidique qui se caractérise par la présence de cellules spumeuses, de lymphocytes T et de cellules musculaires lisses. Ces cellules activées produisent des cytokines proinflammatoires, des facteurs de croissance et une quantité élevée de matrice extracellulaire dans l'espace sous-endothélial. Lorsque l'infiltration des lipoprotéines et leur modification oxydative surpasse la capacité des macrophages à les capter par des récepteurs « scavenger », ils s'accumulent dans l'intima et favorisent la nécrose des cellules spumeuses (Schwartz et al, 1991). Les cellules musculaires lisses de la média migrent vers l'intima, sous l'influence de substances chimiotactiques et prolifèrent sous l'action de mitogènes comme le PDGF (Campbell et Campbell, 1994). Ceci favorise la progression de la lésion vers la plaque avancée, caractérisée par la formation d'une coiffe fibreuse composée de cellules musculaires lisses, de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycans et recouvrant le core lipidique (Aldons, 2000).

La progression de la lésion dépend de l'évolution de la lésion elle-même, et du phénomène de remodelage artériel. La stabilité de la lésion est influencée par la composition cellulaire et lipidique de la coiffe fibreuse, par la calcification et par la néovascularisation. La rupture de la coiffe fibreuse et son érosion engendre la formation de thrombus (Fuster 1994). L'instabilité de la plaque peut résulter de la réponse immunitaire locale et en particulier de la production de métalloprotéinases par les macrophages (Thompson et al, 1995).

Le tableau suivant résume les trois stades de la lésion athéroclérotique et leurs caractéristiques

	Strie lipidique	Lésion fibro-lipidique	Plaque fibreuse
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pénétration et accumulation de LDL-cholestérol dans l'intima artérielle</li> <li>▪ Infiltration des monocytes</li> <li>▪ Formation de cellules spumeuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Monocytes/ macrophages, cellules T, cellules musculaires lisses. Migration de ces dernières cellules vers la média, prolifération et sécrétion de matrice extracellulaire dans l'espace sous-endothélial</li> <li>▪ Accélération de la formation des cellules spumeuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Core lipidique</li> <li>▪ Coiffe fibromusculaire (cellules musculaires lisses et protéines :fibres élastiques, collagène et protéoglycans</li> <li>▪ Agrégation plaquettaire</li> </ul>
Détection	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Asymptomatique, peut être détectable macroscopiquement (épaississement jaunâtre au niveau de l'intima)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lipides intra- et extracellulaire</li> <li>▪ Coiffe fibromusculaire</li> </ul>
Évolution	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Progression ou régression selon la présence ou l'absence de facteurs de risque</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Évolution de la lésion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Complications: thrombose, érosion, ischémie aiguë</li> </ul>

### 3.0 Épaisseur de l'intima-media carotidienne (IMT)

Il a été récemment reconnu que la mesure de l'épaisseur de l'intima-media (IMT) de l'artère carotidienne était un marqueur d'athérosclérose infraclinique et un facteur de prédiction des maladies coronariennes chez les sujets diabétiques de type 2. Des valeurs d'IMT élevées de l'artère carotidienne, permettent de présumer de la présence d'athérosclérose au niveau d'autres artères (Margitic et al, 1991) et une association entre IMT et facteurs de risque de MCV a été démontrée. En effet, certaines études ont montré que les valeurs d'IMT étaient corrélées à divers facteurs de risque conventionnels tels le sexe, l'âge avancé, l'excès pondéral, des niveaux de cholestérol élevé, une hypertension artérielle, le tabagisme, le diabète et la résistance à l'insuline (Simon et al, 2002). Parmi tous ces facteurs, l'hypertension semble élever les valeurs d'IMT d'une façon marquante, probablement par son effet d'hypertrophie médiale. Récemment, une association entre certains nouveaux facteurs de risque des MCV tels l'hyperhomocystéinémie, la lipoprotéine a (Lp(a)), les molécules d'adhésion et la CRP a été proposée. Des études ont rapporté une élévation des mesures d'IMT chez les patients diabétiques de type 2 (Temelkova et al, 1999). Même si l'hyperglycémie a été proposée comme étant responsable de cette anomalie, l'association existante entre hyperglycémie et IMT est mal connue (Yamasaki et al, 1995).

#### **4.0 Facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose associée au diabète de type 2**

Divers facteurs de risque conventionnels tels l'hyperglycémie, l'hypertension, la dyslipidémie, le tabagisme, l'obésité, l'âge et le sexe prédisent, en partie, le développement des MCV chez les patients diabétiques. Récemment, de nouveaux facteurs de risque reliés à l'hyperglycémie, l'insulinorésistance et l'hyperinsulinémie ainsi que de nouveaux mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la vasculopathie diabétique tels la dysfonction endothéliale, les altérations de la coagulation et de la fibrinolyse, le stress oxydatif et l'inflammation systémique ont été identifiés.

##### **4.1 Facteurs de risque conventionnels**

###### **4.1.1 Hyperglycémie**

Diverses études épidémiologiques supportent le concept qu'une augmentation des taux plasmatiques de glucose est associée à un risque cardiovasculaire accru et ce même à des concentrations de glucose en dessous du seuil diabétique (Kaur et al, 2002). En dépit de ce fait, l'importance de l'hyperglycémie per se dans la pathogenèse des MCV associée au diabète est encore débattue. En effet, si l'étude UKPDS a permis de démontrer qu'un contrôle glycémique strict permettait de réduire les complications micro-vasculaires du diabète, cette étude n'a pu démontrer, par cette approche, une diminution significative des complications macro-vasculaires (UKPDS, 2000).

Les médiateurs des effets délétères de l'hyperglycémie sur le système vasculaire incluent l'activation de la voie des pentoses ou polyols, la formation des AGE, l'activation de la PKC et le stress oxydatif.

#### - La voie des polyols

Dans les tissus où la captation de glucose est indépendante de l'insuline comme par exemple les nerfs périphériques, l'exposition au glucose cause une élévation des niveaux de sorbitol et de fructose intracellulaires. On aura alors une activation de l'aldose réductase (AR) et du sorbitol déshydrogénase (SDH), ces deux enzymes constituant la voie des polyols. Il en résulte une augmentation du ratio NADH/NAD<sup>+</sup> (Williamson et al, 1993). Chez les diabétiques ces effets ont pour conséquence, une surproduction d'agents prooxydants qui favorisent l'activation de la PKC. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour clarifier l'association entre la voie des polyols et les MCV chez les sujets diabétiques de type 2 (Ashina et al, 1995).

#### - Formation des produits terminaux de glycation (AGE)

La formation des AGE est un processus lent et complexe qui inclut la glycation. L'hyperglycémie favorise la formation des produits réversibles intermédiaires par des réactions Amidori, puis celle de produits irréversibles qui sont les AGE. Des études ont démontré que les patients diabétiques ont des niveaux élevés d'AGE dans leur plasma et leurs tissus (Hayden et Reaven, 2000). Les AGE ont des effets athérogéniques dans l'organisme. La formation de ces produits favorise le stress oxydatif via la stimulation de la production de radicaux libres par les

macrophages et autres cellules vasculaires (Yan et al, 1994). Par ailleurs les AGE peuvent se former dans les lipides et diverses lipoprotéines et ainsi augmenter l'oxydation et l'athérogénicité des lipoprotéines. En plus de leur interaction directe avec les protéines de la matrice telles le collagène IV, les AGE augmentent la perméabilité endothéliale (Esposito et al, 1989), élèvent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules vasculaires (Vlassara et al, 1995), activent les cellules mésangiales, stimulent la libération de cytokines, favorisent la captation des LDL par les macrophages et augmentent l'agrégation plaquettaire (Hangaishi et al, 1998; Sasaki et al, 1999). Tous ces effets ont pour conséquence d'accélérer la progression vers l'athérosclérose. Certaines études ont rapporté la présence des AGE dans les lésions d'athérosclérose (Brownlee, 1994). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour clarifier la relation entre les niveaux des AGE plasmatiques et le développement des complications macro-vasculaires chez les diabétiques de type 2.

#### - La protéine kinase C (PKC)

L'hyperglycémie stimule la synthèse de diacylglycerol(DAG) et l'activation de PKC. Cette dernière altère la production de l'insuline (Farese 1996) par les îlots du pancréas. L'activation de PKC peut expliquer, en partie, les complications vasculaires chez les diabétiques et est particulièrement impliquée dans la dysfonction endothéliale associée au diabète. L'activation de la PKC médie en outre les altérations fonctionnelles de multiples cellules vasculaires en réponse à divers stimuli proathérogéniques. La vitamine E semble inhiber l'activité de PKC, ce qui suggère un lien entre le stress oxydatif et l'activation de cette kinase (Williams, 1995).

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour clarifier la relation entre la PKC, l'hyperglycémie et l'angiopathie chez les diabétiques.

#### - Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur dégradation. Il résulte une augmentation de production de ces radicaux ou d'un déficit en antioxydants extra et/ou intracellulaires de l'organisme ou encore de la combinaison de ces deux processus (Giugliano et al, 1996). Les niveaux de stress oxydatif sont élevés chez les patients diabétiques de type 2 et pourraient jouer un rôle important dans la vasculopathie diabétique (Baynes et al, 1991). La relation directe entre le stress oxydatif et l'hyperglycémie est encore mal connue chez les diabétiques de type 2 (Sampson et al, 2002). L'hyperglycémie semble induire la génération de radicaux libres par différentes voies : la voie de l'autoxydation de glucose, la voie des polyols, la synthèse élevée de diacylglycérol et l'activation de la PKC, la formation des AGE ainsi que la peroxydation des lipides. Un premier mécanisme suggéré par lequel l'hyperglycémie induit le stress oxydatif chez les patients diabétiques de type 2 est l'autoxydation de glucose. Il en résulte la formation de produits intermédiaires tels l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le radical hydroxyl  $OH^\cdot$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui peuvent oxyder les lipides et les protéines. Les radicaux peroxy peuvent capter des atomes d'hydrogène des lipides, par exemple des acides gras polyinsaturés et produire des hydroperoxydes et ainsi favoriser la régénération des radicaux libres via des enzymes tels la lipoxigénase (LO) stimulent ainsi le développement de l'athérosclérose par l'oxydation des LDL (Kuhn et al, 1994). Des études ont démontré que les niveaux de LDL chez les sujets diabétiques



sont élevés et que ces lipoprotéines sont davantage glyquées et plus susceptibles à l'oxydation que les LDL de sujets non diabétiques (Frietas et al, 1997).

Des études ont rapporté que le stress oxydatif est relié à la dysfonction endothéliale chez les diabétiques (Ting et al, 1996). En effet, les espèces réactives oxygénées (ROS) réagissent avec le NO et diminuent sa biodisponibilité directement, en réduisant la conversion de L-arginine en L-citrulline ou indirectement, en diminuant l'activité de la guanylate cyclase au niveau de l'endothélium (Langenstroer et al, 1992; Johnstone et al, 1993). Les ROS sont produites dans toutes les cellules aérobiques. Ces molécules comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyl et le NO sont des agents d'oxydation. D'autres molécules telles le peroxyde d'hydrogène et la peroxy-nitrite ne sont pas des radicaux libres mais ont des effets prooxydants et participent ainsi au stress oxydatif. Les sources enzymatiques potentiels de ces ROS sont la xanthine oxydase, la NADH/NADPH oxydase, la cytochrome p450 réductase et l'oxyde nitrique synthase endogène (eNOS) (Cai et harrison, 2000).

On mesure les niveaux de stress oxydatif en déterminant dans le plasma ou l'urine des marqueurs de peroxydation lipidique tels les TBARS «thiobarbituric acid reactive substances» ou encore les isoprostanes (Baynes, 1991). Le 8-epi-prostaglandine F2-isoprostane (8-isoprostane) a été détecté dans les plaques athérosclérotiques coronariennes (Ginwotta et al, 1997) et semble être un marqueur spécifique de la peroxydation des lipides in vivo (Morrow et al, 1999). Certaines études ont démontré que les niveaux d'isoprostanes urinaires et plasmatiques sont élevés chez les sujets diabétiques de type 2 (Gopaul et al, 1995). D'autres études ont

démontré des corrélations entre les niveaux de stress oxydatif et certains facteurs de risque des MCV tels l'hyperglycémie chez les diabétiques type 2, le tabagisme (Sampson et al, 2002) et l'hypertension (Giugliano et al, 1996). Cependant, dans la littérature, on n'a pas rapporté une association directe entre les marqueurs de stress oxydatif et le risque de MCV.

#### 4.1.2 Dyslipidémie

L'altération du profil lipidique joue un rôle important dans la vasculopathie du diabète de type 2. La dyslipidémie associée au diabète de type 2 est caractérisée par une triade d'anomalies lipidiques : une hypertriglycéridémie (Laakso et al, 2001, Frietas et al, 1997; Abate et al, 1995), des niveaux bas de HDL et des altérations qualitatives des LDL. L'hypertriglycéridémie est un facteur de risque indépendant de MCV (Austin 1998). Dans le diabète de type 2, des niveaux élevés de triglycérides sont observés à jeun ainsi qu'en période postprandiale. Il est actuellement postulé que l'élévation excessive de lipoprotéines riches en triglycérides en période postprandiale puisse constituer un facteur athérogénique important dans le diabète de type 2. Dans le diabète, les LDL démontrent des altérations qualitatives: elles sont plus petites, plus denses et plus susceptibles à l'oxydation, la glycation ou l'agréation. Les LDL modifiées stimulent divers processus athérogéniques tels la formation de cellules spumeuses, la relâche de cytokines, la différenciation des monocytes en macrophages, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, la perméabilité endothéliale (Gardner et al, 1999) et l'expression de PAI-1 (Dichtl et al, 1999). Alors que les niveaux de LDL chez les sujets diabétiques ont été très longtemps considérés comme normaux, il semble aujourd'hui qu'une diminution de leurs taux en dessous

des valeurs anciennement considérées comme normales puisse diminuer le risque de MCV.

#### 4.1.3 Hypertension

L'hypertension est associée aux MCV et sa prévalence augmente avec l'âge et le sexe (Staessen et al, 1990). L'hypertension se présente dans la majorité des cas en association avec le diabète et l'obésité. L'hypertension artérielle est associée à une dysfonction vasculaire, à une production accrue de radicaux libres tels l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyls et de cytokines proinflammatoires, ce qui favorise la progression de l'athérosclérose (Reaven et al, 1996).

#### 4.1.4 Tabagisme

Le tabagisme est associé à un risque élevé de MCV (Hennekens et al, 1997). Le tabagisme est un facteur responsable de la dysfonction endothéliale et favorise la production de radicaux libres. De plus, on a rapporté que les niveaux d'antioxydants plasmatiques étaient diminués chez les fumeurs et ceux exposés à la fumée de cigarette comparé aux autres (Dietrich et al, 2003). Il a été établi que les fumeurs des deux sexes ont un risque accru de MCV et de mortalité par MCV comparé aux non-fumeurs. De plus, le tabagisme amplifie le risque de MCV associé à d'autres facteurs de risque tels la dyslipidémie et le diabète.

#### 4.1.5 Obésité

Diverses études ont trouvé que l'obésité et particulièrement l'obésité abdominale est associée à un risque accru de MCV (Rexrode et al, 2001; Lemieux et al, 2002). On

attribue ce fait au syndrome métabolique incluant une diminution des niveaux de HDL, une élévation des niveaux de LDL et de triglycérides plasmatiques (Mekki et al, 1999; Lemieux et al, 2002).

#### 4.1.6 Age

Le risque de développement des MCV augmente avec l'âge (Wick et al, 2003). Ce risque est attribuable notamment à l'augmentation de radicaux libres dans la circulation sanguine (Ferrucci et al, 2002).

#### 4.1.7 Sexe

Les hommes sont à plus haut risque de développer les MCV que les femmes. Cependant, le risque de développement des MCV augmente chez les femmes post-menopausées et peut même dépasser celui des hommes (Goldschmid et al, 1994). Ce fait s'explique par la diminution d'œstrogènes circulants, responsables d'une redistribution de l'adiposité au niveau abdominal et d'un profil lipidique proathérogénique caractérisé par une augmentation des niveaux de LDL et de triglycérides plasmatiques et d'une diminution des HDL (Milewicz et al, 2001).

### 4.2 Nouveaux facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques

#### 4.2.1 Dysfonction endothéliale

Des études ont démontré la présence de dysfonction endothéliale chez les femmes souffrant de diabète gestationnel, les sujets insulino-résistants et diabétiques (Lip et al, 1995; DeVries et al, 2001). Des niveaux élevés de divers marqueurs systémiques de dysfonction endothéliale ont été rapportés dans le plasma des sujets

diabétiques de type 2, incluant des concentrations accrues de molécules d'adhésion solubles (Ribau et al, 1999) et des niveaux élevés de PAI-1 (Festa et al, 1999). Les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale chez les patients diabétiques sont multiples. L'hyperglycémie est l'hypothèse la plus rapportée pour expliquer la relation entre le diabète, l'activation et/ou la dysfonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose (Bagg et al, 2001). Les médiateurs de l'hyperglycémie sont l'activation de la voie des polyols, la formation des AGE, le stress oxydatif, la synthèse de diacylglycerol (DAG) et l'activation de la PKC. (Lip et al, 1995; De Vriese et al, 2000). Un lien étroit entre l'insulinorésistance et la dysfonction endothéliale est en outre postulé.

#### 4.2.2 L'altération de la coagulation

Une élévation de certains marqueurs plasmatiques reflétant l'altération de la coagulation a été observée chez les diabétiques de type 2 (Schnider et Sobel, 2001). Le diabète de type 2 est associé à un état d'hypercoagulabilité, avec diminution de la fibrinolyse, activation plaquettaire et augmentation de l'agrégation plaquettaire (Tschoepe et Roesen, 1998). Les altérations des voies de coagulation/fibrinolyse sont reflétées par une élévation de divers facteurs tels le facteur VII, la thrombine, le PAI-1, le fibrinogène et le facteur vWF (Ceriello et al, 1993). L'hyperglycémie semble activer la cascade de la coagulation par différents mécanismes comme la glycation non-enzymatique, l'altération de la synthèse des héparans sulfates et l'élévation du stress oxydatif (Ceriello et al, 1995). Une élévation de certains marqueurs de la cascade de la coagulation/fibrinolyse est associée à un risque accru de MCV. En effet, des marqueurs de l'état fibrinolytique comme le PAI-1 et l'activateur du

plasminogène ont été identifiés comme des facteurs de risque de l'infarctus du myocarde (Thompson et al, 1995). On a aussi rapporté que les niveaux de thrombomoduline soluble, un autre marqueur d'inflammation, étaient associés à une incidence accrue de MCV.

L'obésité semble contribuer, en partie, aux anomalies thrombolytiques observées chez les diabétiques. En effet, l'ARN messenger codant pour le PAI-1 est exprimé par le tissu adipeux (Samad et al, 1996). On a aussi démontré que l'intolérance au glucose est corrélée avec une augmentation de PAI-1 et de tPA chez les sujets souffrant d'intolérance au glucose (Meigs et al, 2000).

#### 4.2.3 Stress oxydatif

Ce mécanisme a été traité précédemment dans la section « hyperglycémie » et ne sera pas rediscuté dans cette section. Il est utile, cependant, de rappeler que les patients diabétiques de type 2 ont des niveaux de stress oxydatif accrus et que cette altération se reflète chez eux par une élévation des taux plasmatiques et urinaires de 8-isoprostane, un marqueur spécifique de peroxydation lipidique (Sampson et al, 2002; Hayden et Reaven 2000).

#### 4.2.4 Inflammation systémique

Il a été récemment démontré que l'inflammation joue un rôle clé dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. Lors d'une inflammation plusieurs marqueurs tels le fibrinogène, la protéine C-réactive (CRP), la protéine amyloïde A et l'orosomucoïde sont synthétisés par le foie. Un autre marqueur de l'activité

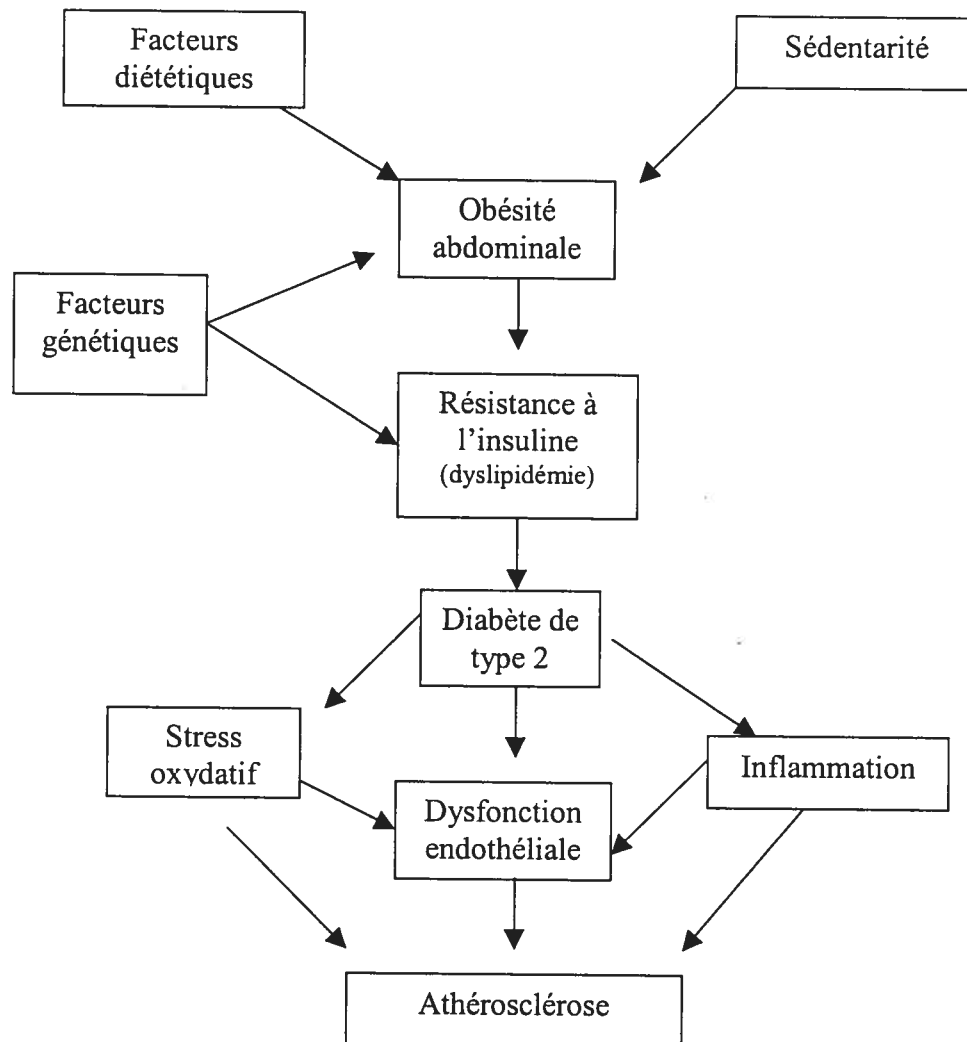
inflammatoire est la leukocytose que certaines études ont rapporté comme étant associée positivement au risque de MCV (Gillum et al, 1993). D'autres marqueurs tels les cytokines et les facteurs de croissance constituent des médiateurs inflammatoires de l'athérosclérose. Chez les sujets diabétiques de type 2, l'activation des macrophages par l'oxydation des lipides et la glycation des protéines et des lipides contribue à la production de cytokines (Nilsson, 1993; Eckel et al, 2002).

Un marqueur d'inflammation fréquemment rapporté dans la littérature est le CRP, un facteur prédictif de MCV chez les individus sains et chez des sujets ayant des maladies ischémiques (Haverkate et al, 1997). On a rapporté, également, une association entre la CRP et le taux de mortalité causé par les MCV (Koing et al, 1999). Les facteurs responsables de l'augmentation de la CRP sont la sécrétion de cytokines tels l'interleukine-6 et le TNF alpha par le tissu adipeux et les macrophages. Des niveaux élevés de CRP ont été rapportés chez les diabétiques de type 2 (Pickup et al, 1997). De plus, l'obésité, en particulier l'obésité centrale et la résistance à l'insuline, ont été associées à des concentrations élevées de CRP (Weyer et al, 2002).

Fait intéressant, on a rapporté une association entre la CRP et les marqueurs de dysfonction endothéliale chez les sujets diabétiques de type 2 (Woodman et al, 2002). On ignore encore si la CRP est seulement un marqueur de dysfonction endothéliale ou s'il existe une relation causale entre CRP et activation endothéliale. Cette dernière possibilité est supportée par de récentes études démontrant que la CRP exerce un effet direct sur l'activation endothéliale (Woolalard et al, 2002).

L'obésité, la sédentarité et une diète mal équilibrée sont les principaux déterminants non génétiques du diabète de type 2. De par leurs effets sur la résistance à l'insuline, la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydatif, ces facteurs contribuent au développement accéléré de l'athérosclérose dans le diabète. Le schéma ci-dessous présente les interactions multiples entre les facteurs de risque du diabète de type 2 et les mécanismes physiopathologiques associés aux complications vasculaires du diabète.

Schéma 2





### **III. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE**

## 1.0 Problématique

Les patients diabétiques sont à haut risque de développer des MCV. Des facteurs de risque conventionnels tels l'hypertension, la dyslipidémie, le tabagisme et le diabète lui-même prédisent, en partie, le développement des MCV. Récemment, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la vasculopathie diabétique tels la dysfonction endothéliale et l'inflammation systémique a permis l'identification de nouveaux marqueurs sériques de risque cardiovasculaire tels les molécules d'adhésion endothéliales et le CRP. Le stress oxydatif est un autre mécanisme impliqué dans la vasculopathie diabétique. Il a été proposé que le 8-isoprostane constitue un marqueur de stress oxydatif chez les patients diabétiques. Cependant, la littérature ne rapporte aucune association directe entre les marqueurs de stress oxydatif et le risque de MCV. La mesure de l'IMT de la paroi de l'artère carotidienne est un facteur de prédiction de risque futur de MCV. Cependant, les relations qui existent entre ces marqueurs eux-mêmes et aussi entre ces marqueurs et les facteurs de risque conventionnels sont mal connues.

## 2.0 Objectifs

- 1) Mesurer les niveaux des marqueurs sériques de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de stress oxydatif ainsi que l'IMT chez un groupe de patients diabétiques de type 2, sans complications macro-vasculaires, et comparer ces valeurs avec celles d'un groupe contrôle des sujets sains.
- 2) Tenter d'établir des corrélations entre ces marqueurs et certains paramètres biochimiques et cliniques des patients diabétiques.

### 3.0 Article

## **LACK OF CONCORDANCE BETWEEN PLASMA MARKERS OF CARDIOVASCULAR RISK AND INTIMA-MEDIA THICKNESS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES**

NADIAH MOUSSAVI, GENEVIÈVE RENIER, MD, PhD, ANDRÉ ROUSSIN,  
MD, JEAN-CLAUDE MAMPUTU, PhD, JEAN BUIHIEU, MD, OMAR SERRI,  
MD, PhD

Research Centre, CHUM, Notre-Dame Hospital and Department of Nutrition,  
University of Montreal, Montreal, Canada

**Key words:** Cardiovascular risk, adhesion molecules, C-reactive protein, oxidative stress, IMT, type 2 diabetes.

**Correspondence:** Omar Serri, MD, PhD  
CHUM, Notre-Dame Hospital  
8<sup>e</sup> Mailloux Pavilion, Room M-8216  
1560 Sherbrooke East  
Montreal, Qc., Canada  
H2L 4M1  
Phone: (514) 890-8000 ext. 25607  
Fax: (514) 412-7603  
E-mail: [REDACTED]

Article soumis à «Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism»,

le 29 janvier 2003

## SUMMARY

Endothelial dysfunction, oxidative stress and systemic inflammation play an important role in the enhanced cardiovascular risk in diabetes. Several studies have reported that carotid IMT, a widely accepted marker of subclinical atherosclerosis, is increased in patients with type 2 diabetes. In the present study, we measured carotid intima-media thickness (IMT), the levels of plasma markers of endothelial dysfunction (sE-selectin, intercellular cell adhesion molecule (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1)), low-grade systemic inflammation (C-reactive protein, (CRP)) and oxidative stress (8-epi-prostaglandin F2 isoprostane (8-isoprostane)) in 40 patients with type 2 diabetes without clinical macrovascular complications and 25 healthy subjects. We then examined the relationships between these markers, carotid artery IMT and various clinical and biochemical parameters. Diabetic patients had higher plasma sE-selectin ( $p=0.03$ ), sICAM-1 ( $p=0.05$ ), CRP ( $p=0.047$ ) and 8-isoprostane ( $p=0.001$ ) concentrations than control subjects. Mean IMT values were identical ( $0.63\pm0.02$  mm) in diabetic (range, 0.40-0.92 mm) and healthy subjects (range, 0.45-0.85 mm). In diabetic patients, stepwise multivariate analysis showed that HbA1c and plasma glucose were independent predictors of sE-selectin ( $r^2=0.19$  and  $r^2=0.17$ ,  $p<0.01$  respectively), whereas waist circumference and body mass index (BMI) were predictors of sICAM-1 ( $r^2=0.27$ ,  $p=0.001$  and  $r^2=0.22$ ,  $p=0.002$  respectively). Waist circumference was the only predictor of CRP ( $r^2=0.2$ ,  $p<0.01$ ) and systolic blood pressure was the only predictor of 8-isoprostane ( $r^2 = 0.19$ ,  $p = 0.006$ ). In control subjects, similar analysis showed that plasma glucose and waist circumference were predictors of sE-selectin and sICAM-1 respectively ( $r^2=0.2$ ,  $p<0.05$ ). These results indicate that type 2 diabetic patients free of clinical

macrovascular complications have elevated plasma markers of cardiovascular risk without having increased IMT. The elevation of these plasma markers prior to the increase in carotid IMT suggests that they may be earlier predictors of development of atherosclerosis in type 2 diabetes than IMT.

## INTRODUCTION

Patients with type 2 diabetes have a 3- to 4-fold increased cardiovascular risk (1). Well-established cardiovascular risk factors including advancing age, hypertension, dyslipidemia and cigarette smoking account only partly for this risk. In the past years, it has become apparent that type 2 diabetes is associated with many novel cardiovascular risk factors, including endothelial dysfunction, low-grade systemic inflammation and oxidative stress. As a result, novel predictors or markers of coronary heart disease in human diabetes such as plasma levels of soluble adhesion molecules, CRP, 8-isoprostane and IMT have been recently identified.

Ultrasonographic measurements of the combined thickness of the carotid intima and media are useful to examine early stages of atherosclerosis and give information on the regression and progression of atherosclerotic lesions (2,3). Intima-media thickness (IMT) is currently considered as the earliest marker of generalized atherosclerosis and has been associated with an increased risk of coronary artery disease (3,4).

Endothelial activation and dysfunction is documented in patients with type 2 diabetes (5). Cellular adhesion molecules expressed on activated endothelial cells,

including E-selectin, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediate the binding and subsequent recruitment of monocytes into the arterial intima (6), steps that are believed to play a critical role in early atherosclerosis (7). Plasma concentrations of soluble cell adhesion molecules are increased in patients with type 2 diabetes (8-10). While sICAM-1 appears to be an early marker of vasculopathy and a predictor of cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes (11-13), sVCAM-1 may rather reflect the extent of atherosclerotic lesions (14,15) and is associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes (16).

The other mechanism which probably plays a fundamental role in atherogenesis is low-grade systemic inflammation (8, 17). C-reactive protein (CRP) is an acute-phase reactant produced by the liver that promotes inflammation at various sites in the organism (18). Multiple studies have shown that CRP is a useful marker and an independent predictor of cardiovascular events in both healthy subjects and patients with pre-existing ischemic heart disease (19, 20). Elevated levels of serum CRP have been reported in patients with type 2 diabetes (21).

The third mechanism which may play a key role in pathogenesis of diabetic vascular complications is oxidative stress. Oxidative stress is considered as a likely source of endothelial damage (22). Plasma 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> isoprostane (8-isoprostane) is emerging as a sensitive marker of in vivo oxidative stress and has been found to be increased in type 2 diabetic patients (23).

The associations and relationships between the plasma markers for cardiac risk outlined above and the carotid IMT in diabetic patients are not well known. In the present study, plasma soluble cell adhesion molecules, CRP and 8-isoprostane were used as markers of endothelial activation, low-grade inflammation and oxidative stress, respectively. The purpose of this study was twofold. Firstly, to examine the levels of these plasma markers in patients with type 2 diabetes without clinical macrovascular complications. Secondly, to evaluate the potential relationships between these markers, carotid IMT and various clinical and biochemical parameters.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Patients**

Patients (n=40) were recruited from our outpatient clinic. Inclusion criteria were age between 40 and 70 years, type 2 diabetes of less than 12 years duration (mean : 5.6 years, range : 1-12), hemoglobin A1c (HbA1c) less than 10% (mean : 7.2 %, range : 6-9.4% ), and treatment with sulfonylurea associated or not with metformin or acarbose. Exclusion criteria were cardiac, renal or hepatic insufficiency, clinical evidence of vascular disease, macroalbuminuria, untreated dyslipidemia or cholesterol-LDL > 4 mmol/L and/or triglycerides > 4 mmol/L, untreated or uncontrolled arterial hypertension, (systolic blood pressure > 150 mmHg, diastolic > 90 mmHg), insulin treatment and antioxidant drugs. Six patients had microalbuminuria (defined as 30-300 mg/24h). Ten patients were treated with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. Seventeen patients were treated with statins and eight women were on estrogen replacement therapy. Five patients were smokers. Twenty-five healthy control subjects recruited from hospital staff and

relatives, matched with patients for age and gender were also studied. They had no hypertension or hyperlipidemia and no family history of diabetes. Furthermore, they did not take any medication and none was smoker. The study was approved by the institutional ethic's committee of the hospital and all patients and controls provided written informed consent.

### **Anthropometric measurements**

Body mass index (BMI) was calculated as the weight in kilograms divided by the square of the height in meters ( $\text{kg/m}^2$ ). Waist circumference (cm) was measured at the umbilical midline to the nearest millimetre with the subject in the standing position.

### **Biochemical parameters**

Blood samples were drawn after an overnight fast. Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and glucose concentrations were measured by automated enzymatic methods (Synchron LX analyzer, Beckman). LDL cholesterol was calculated by the Friedwald formula. HbA1c was assessed by immunoturbidimetry using a commercial Tina-quant kit and Hitachi Analyzer (Roche). Urinary albumin excretion was measured by immunonephelometric assay on Immage Analyzer (Beckman).

### **Determination of soluble adhesion molecule levels**

Determination of plasma levels of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin was performed by ELISA, using commercial kits from R&D Systems (Minneapolis, MN). The detection limits of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin with these assays are less than 0.35, 2 and 0.1 ng/ml, respectively.



**Determination of total 8-Isoprostane levels**

Total plasma 8-isoprostane levels were determined by enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Lipoprotein-bound plasma 8-isoprostane was released by alkaline hydrolysis after protein precipitation with absolute ethanol. The detection limit of this assay is 5 pg/ml. The intra- and interassay coefficients of variation are less than 10%.

**C-reactive protein (CRP)**

CRP levels were assessed by immunoturbidimetry using a Tina-quant, CRP high-sensitive kit and a Hitachi analyzer (Roche). The detection limit of this assay is 0.03 mg/L. The intra- and interassay coefficients of variation are less than 10%.

**Carotid IMT measurements**

Subjects were examined lying with the head turned 45° away from the side being scanned. The ultrasound system used was a high resolution appliance (ATL Model HDI 5000 with software 4252-0899-03-178.04) equipped with a 12.5 MhZ linear array transducer. Images projected were registered with a Sony Video graphic UP-890MD printer. The left and right common carotid arteries were examined at 1cm from the beginning of the dilatation of the carotid bulb, using the longitudinal axis. Measures were made at the level of the posterior wall using anterior, lateral and posterior approaches. IMT was calculated as the mean of six measurements made between the first echogenic line corresponding to lumen-intima and the second echogenic line corresponding to media-adventitia. All measures were done by the same examiner (A.R.). The reproducibility of the IMT measurements was verified by a second ultrasound measurement within 3 months from baseline in 20 control subjects. The within-subject coefficient of variation was 7.3%.

### **Statistical analysis**

Data are reported as mean values  $\pm$  SEM. All variables except 8-isoprostane were normally distributed. Comparison between data of diabetic patients and controls was made using unpaired Student's t-test. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni multiple comparison test and analysis of covariance (ANCOVA) were made to evaluate the effects of adjuvant drugs (statins, ACE inhibitors, metformin and estrogens) and to adjust for BMI. Univariate analyses were made to estimate the relationships between variables. Multivariate regression analyses were made to evaluate the determinants of mean IMT, sE-selectin, sICAM-1, CRP and 8-isoprostane. The latter were considered each as dependent variable and variables selected from univariate analysis were sequentially entered into the model until no remaining candidate variable had a significance level of less or equal to 0.05. All statistical analyses were performed with SPSS for windows version 10 (SPSS Inc., Chicago IL, version 10). Statistical significance was considered when p was less or equal to 0.05.

## **RESULTS**

Anthropometric, clinical and biochemical characteristics of the patients with diabetes and the control subjects are shown in Table 1. Diabetic patients had higher BMI and triglycerides and a trend toward greater waist circumference than control subjects.

### **Carotid IMT**

Mean common carotid IMT value was identical ( $0.63 \pm 0.02$  mm) in diabetic patients (range, 0.40-0.92 mm) and in control subjects (range, 0.45-0.85 mm).

### **Plasma markers**

Compared with controls, patients with diabetes had significant elevation of circulating sE-selectin ( $p=0.03$ ), sICAM-1 ( $p=0.05$ ), CRP ( $p=0.047$ ) and Log-transformed 8-isoprostane ( $p=0.001$ ) concentrations (Table 2). VCAM-1 was not significantly different between the two groups. However, after adjusting for BMI and for triglycerides by analysis of covariance, no differences remained between diabetic patients and control subjects for sE-selectin, sICAM-1 and CRP. 8-isoprostane levels remained significantly different between the two groups ( $p<0.05$ ). There were significant differences in sE-selectin only, within type 2 diabetic patients with the use of statins and estrogen replacement therapy. Patients on statins had lower sE-selectin ( $48.9 \pm 6.1$  ng/ml) than those who were not ( $70.4 \pm 5.2$  ng/ml), ( $p=0.03$ ). Diabetic women taking estrogens had also lower sE-selectin ( $44.6 \pm 7.0$  ng/ml) than those who were not on estrogens ( $75.7 \pm 8.1$  ng/ml), ( $p=0.02$ ). There were no differences for the measured plasma markers with the use of ACE inhibitors and metformin within diabetic patients.

### **Correlations**

In diabetic patients, univariate analysis showed that IMT was correlated only with age ( $r^2=0.18$ ,  $p=0.007$ ). sE-selectin was correlated with plasma glucose concentrations (fig 1, panel A), HbA1c levels (fig 1, panel B) and urinary albumin excretion ( $r=0.4$ ,  $p=0.02$ ). sICAM-1 correlated with BMI (fig 2, panel A) and waist circumference (fig 2, panel B). Finally, there were significant correlations between CRP with BMI (fig 3,

panel A) and waist circumference (fig 3, panel B). sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1 and CRP were correlated with each other significantly ( $P<0.05$ ). 8-isoprostane was only correlated with systolic blood pressure ( $r^2=0.19$ ,  $p=0.006$ ).

In control subjects, sE-selectin correlated with plasma glucose levels ( $r^2=0.2$ ,  $p=0.03$ ). sICAM-1 levels were correlated with BMI values ( $r^2=0.3$ ,  $p=0.02$ ) and waist circumference ( $r^2=0.3$ ,  $p=0.01$ ).

*Just factors / present in diabetes*

Multivariate regression analysis revealed, in diabetic patients, that HbA1c and plasma glucose were independent predictors of sE-selectin ( $r^2=0.19$  and  $r^2=0.17$ ;  $p<0.01$  respectively). Waist circumference and BMI were independent predictors of sICAM-1 ( $r^2=0.27$ ,  $p=0.001$  and  $r^2=0.22$ ,  $p=0.002$ , respectively). Waist circumference was the only predictor of CRP ( $r^2=0.2$ ,  $p<0.01$ ). Systolic blood pressure was the only independent predictor of 8-isoprostane ( $r^2=0.19$ ,  $p=0.006$ ). In control subjects, similar analysis demonstrated that plasma glucose was an independent predictor of sE-selectin ( $r^2=0.2$ ,  $p<0.05$ ) and waist circumference was a predictor of sICAM-1 ( $r^2=0.2$ ,  $p<0.05$ ).

## DISCUSSION

The novel observation of the present study is that patients with type 2 diabetes without clinical macrovascular complications showed increased circulating concentrations of sE-selectin, sICAM-1, CRP and 8-isoprostane without presenting any increase in common carotid IMT. Carotid IMT is correlated with traditional and novel cardiovascular risk factors (14, 24-29). Of these factors, hypertension appears to have the greatest effect on IMT (3), which is a process specifically related to the

atherosclerotic disease (3). At variance with previous studies (30-35), we found that IMT was not increased in patients with type 2 diabetes compared to healthy controls and that IMT values were below the threshold of increased cardiovascular risk (36-39). Close examination of the key determinants of increased IMT in type 2 diabetes and of the clinical characteristics of our study group explain our findings. The association between carotid IMT and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes is well documented. In these subjects, a close relationship of carotid IMT has been established with age, duration of diabetes, high blood cholesterol and elevated blood pressure (30,31,34,35,40-45). Evidence that statins and ACE inhibitors decrease the progression of carotid IMT further stress the importance of hypercholesterolemia and hypertension as critical predictors of early carotid atherosclerosis (46-51). In our study, many diabetic patients were treated for hypertension and hypercholesterolemia and therefore normal IMT values in these subjects may be related to adequate control of these metabolic abnormalities. Also, among our postmenopausal diabetic women, many were treated with estrogens. Since use of HRT has been associated with decreased IMT in both nondiabetic and diabetic women (52,53), this may constitute another possible reason for the normal IMT in our study population.

Carotid IMT is a widely accepted marker of early atherosclerosis (3). The positive association of sICAM-1, sVCAM-1 and CRP (14,26-29) with carotid IMT supports a key role for endothelial and systemic inflammation in atherosclerotic lesion development. Our data showing that sE-selectin, sICAM-1 and CRP are elevated in diabetic patients with normal IMT values suggest that these markers

increase earlier than IMT in type 2 diabetic subjects. Alternatively, these plasma markers may be influenced more prominently than IMT by factors other than hypertension and hypercholesterolemia. An interesting finding of our study is the differential expression of endothelial cell adhesion molecules in our diabetic subjects whereby sE-selectin and sICAM-1 but not sVCAM-1 were elevated. Although the specific roles for these molecules in atherogenesis remains unclear, it has become apparent that in contrast to VCAM-1, E-selectin and ICAM-1 are mostly expressed by endothelial cells, do not show correlation with the extent of atherosclerosis (15) and represent risk factors for cardiovascular events in healthy people (54,55). VCAM-1 is unique in that its expression is mostly prevalent in the intima of atherosclerotic plaques (56), reflects the extent of atherosclerotic lesions (14,15), and has a strong predictive value in patients with atherosclerotic lesions (11-13,16). These data suggest that elevated levels of sE-selectin and sICAM-1 levels, together with increased CRP concentrations in our diabetic group might be markers of a chronic inflammatory condition predisposing to atherosclerosis development, whereas normal levels of sVCAM-1 and normal IMT value would reflect lack of advanced atherosclerotic lesions in our patients. As previously reported (8,57-60), we found that glycemic control indexes are independent predictors of sE-selectin and that BMI and increased waist circumference are independent predictors of sICAM-1. The relation between obesity and sICAM-1 is probably mediated by insulin resistance, a condition closely linked to hypertriglyceridemia in type 2 diabetic patients. Taken collectively, these data further stress the pivotal role of features of the insulin resistance syndrome in inducing proatherogenic endothelial activation in type 2 diabetic patients.

Like sICAM-1, CRP appears to predict cardiovascular events among healthy subjects (17, 19) and was correlated in our study most strongly and independently with abdominal obesity and sICAM in both diabetic patients and normal subjects. These data support the concept that proinflammatory cytokines secreted by the adipose tissue contribute to endothelial activation in type 2 diabetes through their stimulatory effect on CRP. Associations between CRP and endothelial activation has been recently described in type 2 diabetic subjects with treated hypertension (61) and evidence has been provided that CRP exerts direct proinflammatory effects on endothelium, enhancing adhesion molecule expression and monocyte adhesion to endothelium (62, 63). These findings support the hypothesis that CRP is not only a marker of inflammation but may play a direct role in promoting the inflammatory component of atherosclerosis.

Another potential determinant of endothelial dysfunction in diabetes is oxidative stress. In accordance with a previous study (22), we found that plasma levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, were increased in our diabetic patients. In contrast to the results of Davi et al (64), we found no association between plasma 8-isoprostane levels and indexes of glycemic control in our diabetic group. We also found no relationship between these compounds and plasma levels of cell-adhesion molecules, CRP or IMT. The relationship between oxidative stress and plasma markers of cardiovascular risk or IMT has been so far poorly investigated. While carotid IMT was not found to be correlated with plasma 8-isoprostane concentration in patients with familial hypercholesterolemia (65), an inverse association was documented between IMT and plasma levels of lycopene in hypertensive patients

with peripheral vascular disease (66). Recently, a correlation has been reported between leukocyte oxidative stress and serum CRP levels in patients with both hypertension and diabetes, (67). In our study, plasma 8-isoprostane levels were only associated with systolic blood pressure. Given the vasoconstrictive and growth promoting effects of isoprostanes on vascular smooth muscle cells (68), these results raise the possibility that oxidative stress may represent an important biochemical link between hypertension and early atherosclerotic lesion formation in type 2 diabetes.

In conclusion, this study showed that type 2 diabetic patients had elevated plasma markers of endothelium activation, low-grade systemic inflammation and oxidative stress. The elevation of these plasma markers without any increase in carotid IMT suggests that they may be earlier predictors of development of atherosclerosis in type 2 diabetes than IMT. Alternatively, these markers at variance with IMT remain elevated despite control of hypertension and hypercholesterolemia. This raises the possibility that therapies targeting endothelial activation and inflammation may be needed to reduce cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported in part by a research grant from Servier International. The authors thank Mr Robert Boileau for assistance and supervision of statistical analyses. We also thank Mrs Chantal Riel, our research nurse, for the care of patients and Mrs. Joanne Auclair for secretarial assistance.



Table 1. Clinical and biochemical characteristics (mean $\pm$ SE) of the diabetic patients and control subjects

Variables	Type 2 diabetes n=40	Control subjects n=25	P
Age (years)	55.1 $\pm$ 1.2	52.7 $\pm$ 0.7	0.2
Gender (M/F)	26/14	12/13	0.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.4 $\pm$ 0.8	28.0 $\pm$ 0.8	<b>0.01</b>
Waist (cm)	105.9 $\pm$ 2.3	98.8 $\pm$ 2.7	<b>0.06</b>
Systolic blood pressure (mm Hg)	120 $\pm$ 3.2	121 $\pm$ 2.0	0.8
Diastolic blood pressure (mm Hg)	71.6 $\pm$ 1.4	69.4 $\pm$ 1.5	0.3
Cholesterol (mmol/L)	4.8 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.2	0.3
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.8 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	0.2
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.05	1.4 $\pm$ 0.09	0.2
Triglycerides (mmol/L)	1.8 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	<b>0.01</b>
Glucose (mmol/L)	8.9 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.1	<b>&lt;0.0001</b>
HbA1c (%)	7.2 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.05	<b>&lt;0.0001</b>

Table 2. Plasma soluble adhesion molecules, CRP and 8-isoprostane concentrations  
(mean±SE) of diabetic patients and control subjects

Variables	Type 2 diabetes	Control subjects	P
	n=40	n=25	
E-selectin (ng/ml)	61.3±4.5	46.6±4.5	<b>0.03</b>
ICAM-1 (ng/ml)	326±16.1	279.1±14.7	<b>0.05</b>
VCAM-1 (ng/ml)	623±36.4	675.5±65.4	0.5
CRP (mg/L)	5.8±1.3	2.5±0.5	<b>0.047</b>
8-isoprostane (pg/ml)	148.4±30.5	25.1±4.4	<b>0.001</b>

Fig 1. Correlations between sE-selectin and HbA1c (Panel A) and fasting plasma glucose (Panel B) in diabetic patients

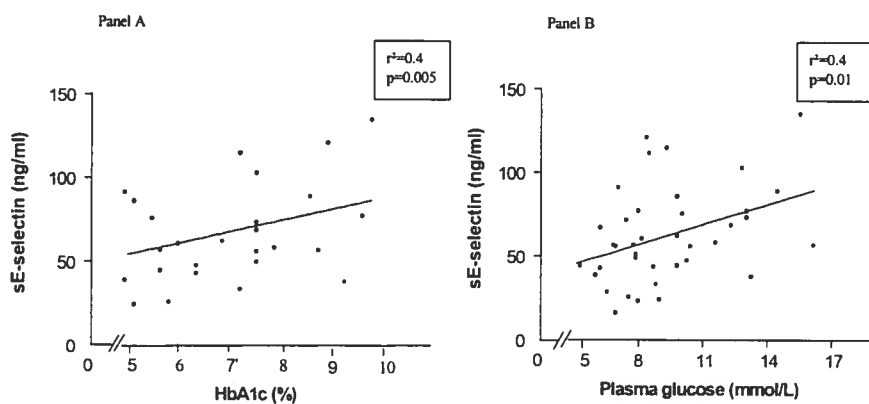


Fig 2. Correlations between sICAM-1 and BMI (Panel A) and waist circumference (Panel B) in diabetic patients

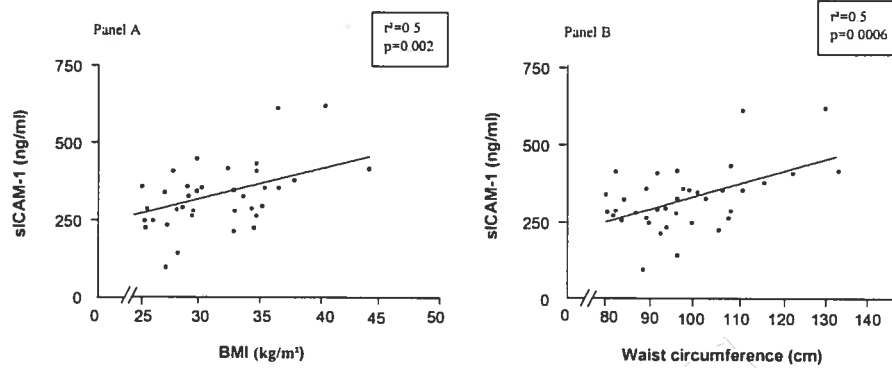
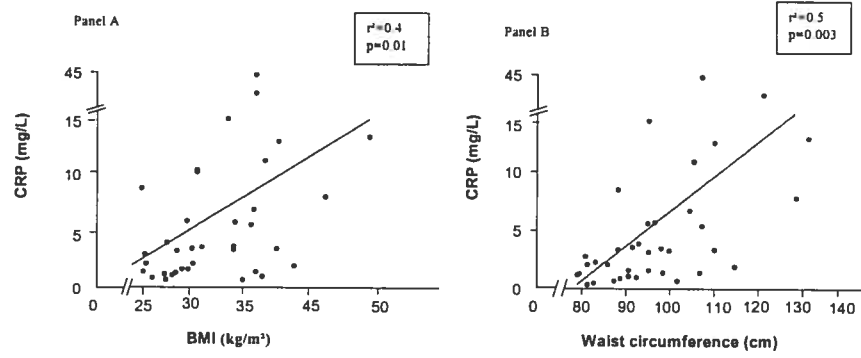


Fig 3. Correlations between CRP and BMI (Panel A) and waist circumference (Panel B) in diabetic patients



## REFERENCES

1. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D: Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care* 16:434-444, 1993
2. Grobbee DE, Bots ML: Carotid artery intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. *J Intern Med* 236:567-573, 1994
3. Simon A, Gariepy J, Chironi G, Megnien J-L, Levenson J: Intima-media thickness; a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertension* 20 :159-169, 2002
4. Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP et al: Prevention conference V: Beyond secondary prevention. Identifying the high-risk patient for primary prevention. Noninvasive tests of atherosclerotic burden: writing group III. *Circulation* 101:16-22, 2000
5. Calles-Escandon J, Cipolla M : Diabetes and endothelial dysfunction; a clinical perspective. *Endocrine Reviews* 22 :36-52, 2001
6. Price TD, Loscalzo J: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107: 85-97, 1999
7. Ross R: Atherosclerosis : an inflammatory disease. *N Engl Med* 340:115-126, 1999
8. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti GM, Moghetti P, Lo Cascio V: Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* 38:1122-1124, 1995

9. Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernest B, Blann AD: Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thrombosis and Haemostasis*. 72 (6):979-984, 1994
10. Fasching P, Waldhäusl W, Wagner OF: Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM-potential mediators in diabetic macroangiopathy (Letter). *Diabetologia* 39:1242-1244, 1996
11. Lim SC., Caballero AE, Smakowski P, Logerfo WF, Horton SE, Veves A: Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* 22:1865-1870, 1999
12. Jude EB, Douglas JT, Anderson SG, Young MJ, Boulton AJ : Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 13 :185, 2002
13. Becker A, van Hinsbergh VW, Jager A, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD : Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest* 32 :1-8, 2002
14. Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S : Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes* 46 :2096-2101, 1997
15. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Allenberg J, Kubbler W, Bode C: Circulating vascular adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating inter-cellular

- adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 17:505-512, 1997
16. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD : Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes The Hoorn Study. *Diabetes* 49 :485-491, 2000
  17. Malakoff D: Does inflammation cut to the heart of the matter ? A growing body of evidence suggests that a molecular marker for inflammation may be as crucial as cholesterol in assessing risk of heart attack. *Science* 296:242-246, 2002
  18. Pepys MB: The acute-phase response and C-reactive protein. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA (eds). *Oxford textbook of medicine*, 2<sup>nd</sup> edn, Oxford University Press: Oxford 1527-1533, 1995
  19. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 336:973-979, 1997
  20. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group: Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *The Lancet* 349:462-466, 1997
  21. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D: NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-1292, 1997



22. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-67, 1996
23. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J: Plasma 8-epi-PGF 2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 225-229, 1995
24. Salonen R, Salonen JT: Determinants of carotid intima-media thickness: A population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. *J Intern Med* 229: 225-31, 1991
25. Heiss G, Sharret AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Azola C: Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 134:250-56, 1991
26. Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo HL, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager AM, Ridker PM: Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1765-1770, 1998
27. Sitzler M, Markus HS, Mendall MA, Liehr R, Knorr U, Steinmetz H: C-reactive protein and carotid intimal medial thickness in a community population. *J Cardiovasc Risk* 9:97-103, 2002
28. Winbeck K, Kukla C, Poppert H, Klingelhofer J, Conrad B, Sander D : Elevated C-reactive protein is associated with an increased intima to media thickness of the common carotid artery. *Cerebrovasc Dis* 13 :57-63, 2002
29. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorogawa S-I, Kuroda A, Matsuhisa M, Kosugi K, Nishikawa N, Kajimoto Y, Hori M : Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young

- subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25 :1432-1438, 2002 Group. *New Engl J Med* 340 :14-22, 1999
30. Kawamori R, Yamasaki Y, Matsushima H, Nishizawa H, Nao K, Hougaku H, Maeda H, Hanada N, Matsumoto M, Kamada T: Prevalence of carotid atherosclerosis in diabetic patients. *Diabetes Care* 15:1290-1294, 1992
  31. Pujia A, Gnasso A, Irace C, Colonna A, Mattioli PL: Common carotid arterial wall thickness in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 17: 1330-1336, 1994
  32. Geroulakos G, Ramaswami G, Veller MG, Fisher GM, Renton S, Nicolaides A, Waldron HA, Diamond J, Elkeles RS : Arterial wall changes in type 2 diabetic subjects. *Diabet Med* 11 :692-695, 1994
  33. Kanters SDJM, Algra A, Banga J-D: Carotid intima-media thickness in hyperlipidemic type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 20:276-280, 1997
  34. Temelkova-K TS, Koehler C, Leonhardt W, Schaper F, Henkel E, Seigert G, Hanefeld M: Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 22:333-338, 1999
  35. Niskanen L, Rauramaa R, Miettinen H, Haffner SM, Mercuri M, Uusitupa M : Carotid artery intima-media thickness in elderly patients with NIDDM and in nondiabetic subjects. *Stroke* 27 :1986-1992, 1996
  36. Salonen JT, Salonen R : Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 11 :1245-1249, 1991
  37. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX : Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall

- thickness and major risk factors : the Atherosclerosis Risk in Communities (ARCI) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 146 :483-494, 2000
38. Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX , Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ et al: Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke : the Atherosclerosis Risk in Communities (ARCI) Study. *Am J Epidemiol* 151 :478-487, 2000
  39. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK : Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *New Engl J Med* 340 :14-22, 1999
  40. Lange LA, Bowden DW, Langefeld CD, Wagenknecht LE, Carr JJ, Rich SS, Riley WA, Freedman BI : Heritability of carotid artery intima-medial thickness in type 2 diabetes. *Stroke* 33 :1876-1881, 2002
  41. Kong C, Elatrozy T, Anyaoku V, Robinson S, Richmond W, Elkeles RS : Insulin resistance, cardiovascular risk factors and ultrasonically measured early arterial disease in normotensive type 2 diabetic subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 16 :448-453, 2000
  42. Wagenknecht LE, D'Agostino R Jr, Savage PJ, O'Leary DH, Saad MF, Haffner SM : Duration of diabetes and carotid wall thickness : the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Stroke* 28 :999-1005, 1997
  43. Frost D, Friedl A, Beischer W : Determinants of early carotid atherosclerosis progression in young patients with typw 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110 :92-94, 2002

44. Matsumoto K, Sera Y, Nakamura H, Ueki Y, Miyake S : Correlation between common carotid arterial wall thickness and ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 51 :244-247, 2002
45. Taniwaki H, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Kanda H, Maekawa K, Nishizawa Y, Morii H : Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22 :1581-1587, 1999
46. Salonen R, Nyyssonen K, Porkkala E, Rummukainen J, Belder R, Park JS, Salonen JT : Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary prevention trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation* 92 :1758-1764, 1995
47. Mercuri M, Bond MG, Sirtori CR, Veglia F, Crepaldi G, Feruglio FS et al. Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptomatic hypercholesterolemic Mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *Am J Med* 101 :627-634, 1996
48. Crouse III JR, Byington RP, Bond G, Espeland MA, Craven TE, Sprinkle JW et al : Pravastatin, lipids, and atherosclerosis in the carotid arteries (PLAC II). *Am J Cardiol* 75 :455-459, 1995
49. De Groot E, Jukema JW, Montauban van Swijndregt AD, Zwinderman AH, Akerstaff RG, van der Steen AF et al : B-mode ultrasound assessment of pravastatin treatment effect on carotid and femoral artery walls and its correlations with coronary arteriographic findings: a report of the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *J Am Coll Cardiol* 31 :1561-1567, 1998

50. Smilde TJ, Wissen SV, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJP, Stalenhoef AFH : Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia (ASAP) : a prospective, randomized double blind trial. *Lancet* 357 :577-581, 2001
51. Lonn EM, Yusuf S, Dzvik V, Doris CI, Yi Q, Smith S et al, for the SECURE investigators : Effects of Ramipril and vitamin E on atherosclerosis. The study to evaluate ultrasound changes in patients treated with Ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 103 :919-925, 2001
52. Dubuisson JT, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Haffner SM, Rewers M, Saad MF, Laws A, Herrington DM : Association of hormone replacement therapy and carotid wall thickness in women with and without diabetes. *Diabetes Care* 21 :1790-1796, 1998
53. Espeland MA, Applegate W, Furberg CD, Lefkowitz D, Rice L, Hunninghake D : Estrogen replacement therapy and progression of intimal-medial thickness in the carotid arteries of postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 142 :1011-1019, 1995
54. de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM : Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 36 :423-426, 2000
55. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N : C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342 :836-843, 2000
56. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD : Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications

- for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 92 :945-951, 1993
57. Albertini JP, Valensi P, Lormeau B, Aurousseau MH, Ferrière F, Attali JR, Gattegno L: Elevated concentrations of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM: effect of intense insulin treatment. *Diabetes Care* 21:1008-1013, 1998
  58. Ryysy L, Yki-Järvinen H: Improvement of glycemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24: 549-554, 2001
  59. Blüher M, Unger R, Rassoul F, Richter V, Paschke R: Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or type II diabetes. *Diabetologia* 45:210-216, 2002
  60. Bagg W, Ferri C, Desideri G, Gamble G, Ockelford P and Braatvedt G: The Influences of obesity and glycemic control on endothelial activation in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5491-5497, 2001
  61. Woodman JR, Watts GF, Puddey IB, Burke V, Mou TA, Hodgson JM, Beilin LJ: Leukocyte count and vascular function in type 2 diabetic subjects with treated hypertension. *Atherosclerosis* 163:175-181, 2002
  62. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH : Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102: 2165-2168, 2000
  63. Woollard KJ, Phillips DC, Griffiths HR : Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 130 :256-262, 2002

64. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C : In vivo formation of 8-iso-prostaglandin 2alpha and platelet activation in diabetes mellitus : effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99 :224-229, 1999
65. Raal FJ, Pilcher GJ, Waisberg R, Buthelezi EP, Veller MG, Joffe BI : Low-density lipoprotein cholesterol bulk is the pivotal determinant of atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 83 :1330-1333, 1999
66. Gianetti J, Pedrinelli R, Petrucci R, Lazzerini G, De Caterina M, Bellomo G, De Caterina R : Inverse association between carotid intima-media thickness and the antioxidant lycopene in atherosclerosis. *Am Heart J* 143 :467-474, 2002
67. Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J : Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* 39 :777-780, 2002
68. Cracowski J-L, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G : vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res* 38 :93-103, 2001

#### **IV. DISCUSSION**



Le diabète de type 2 est une maladie à développement épidémique et ce à travers le monde. Cette augmentation dramatique de prévalence est étroitement liée à l'incidence accrue de l'obésité et d'un mode de vie sédentaire dans les pays développés et en voie de développement. Cette relation est particulièrement démontrée par le fait qu'un pourcentage important de cas de diabète peuvent être prévenus par la diète et l'exercice (Tumilehto et al, 2001). Le diabète de type 2 est associé à un risque accru de MCV. La pathogenèse de l'athérosclérose accélérée associée au diabète de type 2 est complexe et multifactorielle. Outre les facteurs de risque conventionnels des MCV, tels la dyslipidémie, l'hypertension, le sexe et le tabagisme, il apparaît que le diabète de type 2 est communément associé à divers nouveaux facteurs de risque résultant largement de l'insulinorésistance, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Ces nouveaux facteurs de risque incluent la dysfonction endothéliale, l'inflammation, le stress oxydatif, la formation de AGE et les altérations de la coagulation.

De fait, il est établi que les sujets diabétiques ont une altération de la fonction endothéliale, tel que reflétée par une augmentation des taux plasmatiques de marqueurs de dysfonction endothéliale: PAI-1, t-PA, vWF et molécules d'adhésion endothéliales solubles (Stehouwer et al, 1996). De manière intéressante, la dysfonction endothéliale est présente très précocement dans le cours de la maladie, étant objectivable chez les sujets à risque de développement de diabète et insulinorésistants bien avant le développement d'une hyperglycémie franche (Lip et al, 1995; De Vriese et al, 2000). Il est reconnu aujourd'hui que la dysfonction endothéliale est associée au développement de complications vasculaires dans le

diabète (Bagg et al, 2001). L'athérosclérose est une maladie inflammatoire (Aldons, 2000) et il a été démontré que divers marqueurs plasmatiques d'inflammation systémique tels le fibrinogène et la CRP sont élevés chez les sujets diabétiques et constituent des prédicteurs de risque de MCV (Hayden et Reaven, 2000). Enfin, les patients diabétiques montrent des niveaux de stress oxydatif accrus et une augmentation des niveaux plasmatiques et urinaires de 8-isoprostanes, un marqueur spécifique de stress oxydatif (Gopaul et al, 1995; Morrow et al, 1999).

Au cours des dernières années, des marqueurs de dysfonction endothéliale d'inflammation systémique, de stress oxydatif et d'athérosclérose infraclinique incluant les molécules d'adhésion endothéliales solubles, la CRP, les 8-isoprostanes et l'IMT ont été identifiés comme soit facteurs prédicteurs ou associés aux MCV chez le sujet diabétique (Hayden et al, 2000; Simon et al, 2002). Tel que documenté dans notre étude, nos résultats démontrent que ces divers marqueurs sont élevés dans le plasma de sujets diabétiques de type 2. L'augmentation des molécules d'adhésion endothéliales solubles que nous avons observée apparaît spécifique. En effet, nous avons documenté une augmentation de sE-sélectine et de sICAM-1 dans le plasma de notre échantillon de patients diabétiques sans altération concomitante de sVCAM-1. Le fait que E-sélectine soit exprimée exclusivement par les cellules endothéliales et soit augmentée chez les sujets diabétiques traduit de manière irrévocable l'activation endothéliale chez ces patients. Notre étude démontre que l'hyperglycémie est le déterminant majeur de cette altération suggérant ainsi que la sE-sélectine puisse constituer un marqueur sensible des effets de l'hyperglycémie chronique sur l'activation endothéliale dans le diabète. L'association entre les niveaux plasmatiques de cette molécule d'adhésion et ceux de CRP, traduit bien le lien étroit entre

inflammation et activation endothéliale et suggère que cette protéine puisse représenter un marqueur de la réponse inflammatoire endothéliale. Des données récentes suggèrent aussi que la CRP puisse exercer des effets pro-inflammatoires directs sur l'endothélium. En effet, il a été démontré que la CRP induit l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Woollard et al, 2002). De plus, il a été récemment rapporté que la CRP augmente l'expression de PAI-1 par les cellules endothéliales aortiques chez l'humain (Devaraj et al, 2003). Ces données suggèrent que des thérapies visant à réduire les niveaux plasmatiques de CRP puissent réduire la dysfonction endothéliale et possiblement les MCV associées au diabète.

Tel que mentionné précédemment nous avons aussi documenté une augmentation des niveaux plasmatiques de sICAM-1 chez nos patients diabétiques. En accord avec la littérature (Bagg et al, 2001), nos résultats indiquent que les déterminants majeurs de cette altération sont l'IMC et l'obésité abdominale et que les niveaux de CRP corrélaient avec ceux de sICAM-1. Ces données appuient le concept que la production de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux, qui sont des médiateurs documentés de la production de CRP, et l'insulinorésistance associée à l'obésité soient des facteurs pathogéniques importants dans l'activation endothéliale associée au diabète. La relation entre l'insulinorésistance et l'activation endothéliale a été particulièrement bien démontrée par Chen et al (1999) qui ont rapporté une augmentation des niveaux de molécules d'adhésion solubles chez des individus insulinorésistants non diabétiques et normotendus. Cette observation fournit une explication possible du fait que l'insulinorésistance est un facteur de risque indépendant de MCV (Chen et Reaven, 1997; Yip et al, 1998). A l'opposé de la E-

sélectine, ICAM-1 n'est pas produite de manière exclusive par les cellules endothéliales. Une augmentation des niveaux plasmatiques de sICAM-1 est un marqueur précoce de vasculopathie chez les sujets diabétiques (Lim et al, 1999; Hulthe et al, 2002) et est associée à un risque accru de morbidité et de mortalité cardiovasculaire chez ces patients (Jager et al, 2000; Becker et al, 2002; Jude et al, 2002). Son augmentation dans notre population diabétique peut donc traduire l'existence possible d'un processus athérosclérotique infraclinique.

Il est intéressant également de noter que les altérations de sE-selectine et sICAM-1 que nous avons documentées sont observées chez des patients à majorité normoalbuminuriques. Alors qu'il est bien documenté que la microalbuminurie est étroitement associée à la dysfonction endothéliale et est un facteur de risque de MCV (Stehouwer et al, 1996), nos données en accord avec celles de Lim et al (1999) démontrent l'expression de marqueurs de dysfonction endothéliale chez des sujets normoalbuminuriques. Ceci suggère que le processus de dysfonction endothéliale chez le sujet diabétique est opérant bien avant le développement de la microalbuminurie.

L'absence d'augmentation des niveaux plasmatiques de sVCAM-1 dans notre population diabétique peut à priori paraître surprenante au vu des nombreuses publications documentant une augmentation des niveaux sériques de sVCAM-1 chez les sujets diabétiques (Lim et al, 1999; Jager et al, 2000). Cependant, un examen approfondi des données de la littérature à ce sujet montre que cette altération est souvent rapportée dans de larges et dès lors peu homogènes cohortes de sujets

diabétiques ainsi que chez des patients diabétiques avec maladie athérosclérotique ou présentant des risques élevés de MCV (Otsuki et al, 1997; Jager et al, 2000). Le contrôle adéquat de facteurs de risque cardiovasculaires majeurs tels l'hypertension et l'hypercholestérolémie dans notre population diabétique ainsi que les valeurs d'IMT normales semblent indiquer que ces patients ne sont pas porteurs de lésions athérosclérotiques avancées. Étant donné que sVCAM-1 est un marqueur de progression de lésions athérosclérotiques (Jager et al, 2000) et corrèle avec les valeurs d'IMT (Otsuki et al, 1997), les niveaux normaux de sVCAM-1 plasmatiques et l'absence d'augmentation de l'IMT chez nos patients diabétiques semblent indiquer une présence peu importante de lésions athérosclérotiques chez eux.

En résumé nos données démontrent l'induction sélective de sE-selectine et de sICAM-1 dans une population de patients diabétiques sans évidence de maladies cardiovasculaires et dont les niveaux moyens de tension artérielle et de cholestérol sont comparables aux sujets sains. En accord avec la littérature, elles confirment le rôle majeur du contrôle glycémique et de l'obésité et par conséquent de l'insulinorésistance accompagnée d'hypertriglycémie dans ces altérations. Au vu de l'association entre dysfonction endothéliale et développement de MCV dans le diabète, il semble que la mesure des niveaux plasmatiques de marqueurs de dysfonction endothéliale, tels les molécules d'adhésion endothéliales solubles soit un moyen sensible et précoce permettant de préciser le risque cardiovasculaire d'un patient diabétique.

Il est bien connu que des niveaux élevés de CRP, une protéine de la phase aiguë, sont un reflet de l'activité inflammatoire. Le fait que la CRP prédise le

développement du diabète de type 2 indépendamment de facteurs de risque établis incluant l'hyperglycémie et l'IMC (Pradhan et al, 2001; Festa et al, 2002; Freeman et al, 2002) démontre l'importance de l'inflammation dans la pathogenèse de cette maladie. Des concentrations plasmatiques élevées de CRP sont associées à un risque accru de mortalité cardiovasculaire chez les sujets non diabétiques et diabétiques (Jager et al, 1999) et il a été démontré récemment que ce paramètre était même un facteur de risque cardiovasculaire plus puissant que le LDL cholestérol (Ridker et al, 2002). Ces données indiquent que la mesure de CRP est un facteur de prédiction du développement du diabète et de ses complications cardiovasculaires.

Tel que démontré antérieurement (Pickup et al, 1997; Pradhan et al, 2001), nos données démontrent une augmentation significative de CRP plasmatique chez les sujets diabétiques de type 2. En accord avec les résultats d'études antérieures (Yudkin et al, 1999; Festa et al, 2000), nos données montrent que cette anomalie est corrélée avec l'obésité abdominale, suggérant un rôle majeur de la graisse corporelle et de l'insulinorésistance dans cette anomalie. Les mécanismes potentiellement impliqués dans cette relation incluent la production de cytokines par le tissu adipeux, des facteurs bien connus pour leur effet stimulant sur la synthèse hépatique de CRP. Tel que mentionné, notre observation que les niveaux de CRP corrélaient avec ceux de E-sélectine et de ICAM-1 indique la relation étroite entre inflammation systémique et activation endothéliale et suggère en outre, au vu de récentes études (Woollard et al, 2002) un rôle direct de la CRP sur l'activation endothéliale.

Les patients diabétiques ont des niveaux accrus de stress oxydatif semblant résulter d'une augmentation de production de ROS et d'une diminution de défenses

antioxydantes et cette anomalie est impliquée dans la pathogenèse des complications vasculaires du diabète (Evans et al, 2002). En accord avec les résultats de Gopaul et al (1995), nous avons enfin trouvé que le diabète de type 2 était associé à une concentration plasmatique accrue de 8-isoprostanes. Alors qu'une corrélation avait été établie entre les niveaux de glycémie et l'augmentation de peroxydation lipidique chez des sujets diabétiques de type 1 et 2 (Davi et al, 1999; Sampson et al, 2002), nous avons pour notre part objectivé une association entre les niveaux plasmatiques de 8-isoprostanes chez les sujets diabétiques de type 2 et l'hypertension. Cette relation entre ces deux paramètres est particulièrement intéressante considérant le rôle du stress oxydatif comme médiateur des effets vasoconstricteurs de peptides tels que l'angiotensine II (Usui and Egashir, 2002) et l'effet vasoconstricteur et mitogénique des F2-isoprostanes sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Natarajan et al, 1996). Ces données suggèrent que le stress oxydatif puisse représenter un facteur contributif au développement de l'hypertension associé au diabète. Le stress oxydatif est un facteur pathogénique impliqué dans la dysfonction endothéliale et certaines études ont démontré une amélioration de la fonction endothéliale par administration d'antioxydants (Rodriguez et al, 2002). Une étude démontrant une corrélation indépendante entre les niveaux plasmatiques de CRP et ceux de peroxydes lipidiques a en outre postulé un rôle du stress oxydatif dans l'inflammation systémique associée au diabète de type 2 (Arnalich et al, 2000).

L'IMT constitue un index d'athérosclérose infraclinique et représente donc un facteur de prédiction de risque futur de MCV (Simon et al., 2002). Une relation étroite a été établie entre les valeurs de l'IMT et divers facteurs de risque

cardiovasculaires incluant le sexe, l'âge, l'obésité, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète et l'hyperinsulinémie (Fujii et al, 1997) et le tabagisme. Fait important, de tous les facteurs de risques conventionnels, l'hypertension semble celui qui a le plus d'impact sur l'IMT (Simon et al, 2002) et ce probablement par ses effets sur l'hypertrophie médiale (Gariépy et al, 1995; Wendelhag et al, 1996; Poli et al, 1988). De nouveaux facteurs de risque tels la CRP (Sitzer et al, 2002; Magyar et al, 2003), la taille des LDL, l'hyperhomocystéinémie, les molécules d'adhésion endothéliales (Rohde et al, 1998) montrent aussi une association avec l'IMT. Diverses études ont démontré que l'IMT était augmenté dans la population diabétique (Kanters et al, 1997). Dans cette population, des niveaux accrus de sICAM-1, sVCAM-1 et de CRP ont été associés à des valeurs élevées de l'IMT (Rhode et al, 1998; Okano et al, 2002; Stizer et al, 2002). De manière à priori surprenante nous n'avons pas documenté d'augmentation de l'IMT chez nos sujets diabétiques de type 2. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce fait : tout d'abord, il est extrêmement important de considérer le fait que notre population diabétique était très largement normotendue et normocholestérolémique du fait de traitement par statines et inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Comme mentionné précédemment, il a été bien documenté que l'hypertension est un facteur déterminant majeur de l'IMT (Gariépy et al, 1995; Wendelhag et al, 1996; Csanyi et al, 2001) et que l'administration d'agents antihypertenseurs tels les ACE inhibiteurs ou les bloqueurs de canaux calciques inhibe la progression de l'IMT au niveau carotidien (Pitt et al, 2000; Simon et al, 2001; Lonn et al, 2001; Zanchwtti et al, 2002). Le rôle de l'hypercholestérolémie sur l'IMT (Poli et al, 1988; Gariépy et al, 1995; Wendelhag et al, 1996) et la réduction du niveau de ce paramètre par l'administration



de statines a aussi été rapporté (Furberg et al, 1994; Mercuri et al, 1996; MacMahan et al, 1998; Smiled et al, 2001). Au vu du rôle majeur de l'hypertension et de l'hypercholestérolémie comme facteurs d'impact sur l'IMT, il est tentant de spéculer que les valeurs d'IMT normales dans notre population diabétique puissent au moins être partiellement attribuables au contrôle adéquat de la tension artérielle et des niveaux plasmatiques de cholestérol total et de LDL cholestérol chez nos sujets diabétiques. Une autre facteur pouvant contribuer aux valeurs normales d'IMT chez nos sujets diabétiques est l'hormonothérapie substitutive de remplacement (HRT) que recevait plusieurs de nos patientes. Cette possibilité est supportée par l'observation que des femmes diabétiques sous HRT démontraient des valeurs d'IMT inférieures à des femmes non traitées (Dubuisson et al, 1998). De manière intéressante nous avons observé en accord avec les données de Segger et al (2002) que les patientes sous HRT avaient également des niveaux plasmatiques de molécules d'adhésion solubles inférieures à celles qui ne recevaient pas d'œstrogènes suggérant un effet bénéfique de ces composés sur la dysfonction endothéliale. Enfin, il est possible que les valeurs d'IMT normales dans notre population soient dues à une durée peu prolongée de la maladie (5 ans en moyenne) chez nos sujets. Cette possibilité est supportée par le fait que l'IMT est corrélé avec la durée du diabète (Taniwaki et al, 1999). Alternativement nous ne pouvons pas exclure que l'absence de différences de valeurs d'IMT entre notre groupe diabétique et notre groupe contrôle puisse être attribuable à des valeurs d'IMT élevées dans ce dernier groupe. Bien que les valeurs d'IMT que nous avons documentées dans notre groupe contrôle soient parfaitement conciliables avec celles rapportées précédemment dans de larges échantillons de sujets normaux (Simon et al, 2002), cette hypothèse ne peut être totalement exclue au vu de

de statines a aussi été rapporté (Furberg et al, 1994; Mercuri et al, 1996; MacMahan et al, 1998; Smiled et al, 2001). Au vu du rôle majeur de l'hypertension et de l'hypercholestérolémie comme facteurs d'impact sur l'IMT, il est tentant de spéculer que les valeurs d'IMT normales dans notre population diabétique puissent au moins être partiellement attribuables au contrôle adéquat de la tension artérielle et des niveaux plasmatiques de cholestérol total et de LDL cholestérol chez nos sujets diabétiques. Une autre facteur pouvant contribuer aux valeurs normales d'IMT chez nos sujets diabétiques est l'hormonothérapie substitutive de remplacement (HRT) que recevait plusieurs de nos patientes. Cette possibilité est supportée par l'observation que des femmes diabétiques sous HRT démontraient des valeurs d'IMT inférieures à des femmes non traitées (Dubuisson et al, 1998). De manière intéressante nous avons observé en accord avec les données de Segger et al (2002) que les patientes sous HRT avaient également des niveaux plasmatiques de molécules d'adhésion solubles inférieures à celles qui ne recevaient pas d'œstrogènes suggérant un effet bénéfique de ces composés sur la dysfonction endothéliale. Enfin, il est possible que les valeurs d'IMT normales dans notre population soient dues à une durée peu prolongée de la maladie (5 ans en moyenne) chez nos sujets. Cette possibilité est supportée par le fait que l'IMT est corrélé avec la durée du diabète (Taniwaki et al, 1999). Alternativement nous ne pouvons pas exclure que l'absence de différences de valeurs d'IMT entre notre groupe diabétique et notre groupe contrôle puisse être attribuable à des valeurs d'IMT élevées dans ce dernier groupe. Bien que les valeurs d'IMT que nous avons documentées dans notre groupe contrôle soient parfaitement conciliables avec celles rapportées précédemment dans de larges échantillons de sujets normaux (Simon et al, 2002), cette hypothèse ne peut être totalement exclue au vu de

l'adiposité relative de certains de nos sujets contrôles, un facteur associé à une augmentation des valeurs d'IMT (Garipey et al, 1998).

De plus, nous sommes conscients du fait que les mesures des circonférences abdominales diffèrent chez les hommes et chez les femmes. Nous avons considéré ces mesures séparément pour chacun de sexe, cependant les résultats n'étant pas significativement différents, nous avons pris l'échantillon mixte et avons effectué les tests de statistique.

Indépendamment de toutes ces considérations, l'aspect nouveau et sans conteste original de notre étude est l'observation que des sujets diabétiques sans évidence de complications cliniques macro-vasculaires puissent présenter de manière isolée un accroissement des taux plasmatiques de marqueurs de dysfonction endothéliale et d'inflammation systémique et ce sans altération de leur IMT. Ces résultats suggèrent que l'élévation de marqueurs périphériques de MCV puissent précéder celle de l'IMT. Elles suggèrent aussi que la seule détermination de l'IMT dans la population diabétique, extrêmement hétérogène de par définition, puisse être, à elle seule, insuffisante pour estimer le risque cardiovasculaire associé au diabète de type 2. Ceci pourrait être particulièrement vrai chez des sujets diabétiques normotendus, normocholestérolémiques ou traités par HRT. Au vu de l'importance majeure des niveaux de CRP comme facteur de risque des MCV (Ridker et al, 2002), une détermination conjointe de cette protéine et de l'IMT semble une conduite à envisager pour estimer avec davantage de précision le risque cardiovasculaire d'un patient diabétique et assurer un suivi fiable de la thérapie.

## **V. BIBLIOGRAPHIE**

Abate N, Vega GL, Garg A, Grundy S. Abnormal cholesterol distribution among lipoprotein fractions in normolipidemic patients with mild NIDDM. *Atherosclerosis* 118:111-122, 1995

Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-G J, Grundy SM. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in man. *J Clin Invest* 96:88, 1995

Aldons JL. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241, 2000

Arnalich F, Hernaz A, Copez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 32:407-412, 2000

Asahina T, Kahiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high-glucose medium. *Diabetes* 44:520-526, 1995

Austin MA. Plasma triglycerides as a high risk factor for cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 14: B14-17, 1998

Bagg W, Ferri C, Desideri G, Gamble G, Ockelford P, Braatvedt DG. The influences of obesity and glycemic control on endothelial activation in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5491-5497, 2001

Baynes JW :Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991

Becker A, van Hinsbergh VW, Jager A, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Why soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest* 32(1):1-8, 2002

Brownlee J. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43:836-841, 1994

Cai H and Harisson GD. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. The role of oxidative stress. *Circulation Research* 87:840-844, 2000

Campbell J, Campbell G. Cell biology of atherosclerosis. *J Hypertens* 12:S129-132, 1994

Ceriello A. Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycemia and therapeutic prospects. *Diabetologia* 36:1119-1125, 1993

Ceriello A, Giacomello R, Stel G, Motz E, Taboga C, Tonutti L, Pirisi M, Falletti E, Bartoli E. Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes. The possible role of oxidative stress. *Diabetes* 44:924-928, 1995

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willet WC. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17:961, 1994

Chen NG, Holmes M, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, soluble adhesion molecules, and mononuclear cell binding in healthy volunteers. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84(10):3485-3489, 1999

Chen YD, Reaven GM. Insulin resistance and atherosclerosis. *Diabetes Rev* 5:331-342, 1997

Csanyi A, Egervari A, Nagy Z. Influence of hypertension and smoking as the single vascular risk factors on the intima-media thickness. *Eur J Epidemiol* 17(9):855-861, 2001

Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-isoprostane F2-alpha and platelet activation in diabetes mellitus. Effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99(2):224-229, 1999

De Fronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 5:177-269, 1997

Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 107(3):398-404, 2003

De Vriese As, Verbeuren TJ, Van De Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130:963-974, 2000

Dietrich M, Block G, Norkus EP, Hudes M, Traber MG, Cross CE, Packer L. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 77(1):160-166, 2003

Dichtl W, Stiko A, Eriksson P, Goncalves I, Calara F, Banfi C, Ares MP, Hamsten A, Nilsson J. Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:3025-3032, 1999

Dubuisson JT, Wagenknecht LE, D'Agostino BR, Haffner MS, Rewers M, Saad FM, Laws A, Herrington MD. Association of hormone replacement therapy and carotid wall thickness in women with and without diabetes. *Diabetes care* 21(11):1790-1796, 1998

Eckel RH, Wassef M, Chait A, Sobel B, Barrett E, King G, Lopes-Virella M, Reusch J, Ruderman N, Steiner G, Vlassara H. Prevention conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease. Writing Group II: Pathogenesis of Atherosclerosis in diabetes. *Circulation* 105:e138-e145, 2002

Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170:1387-1407, 1989

Evans LJ, Goldfine DI, Maddux AB, Grodsky MG. Oxidative stress and stress-activated signaling pathway: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 23:599-622, 2002



Farese RV. Protein kinase C. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I, Taylor and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia 187-197, 1996

Ferrucci L, Cavazzini C, Corsi A, Bartali B, Russo CR, Lauretani F, Ferrucci L, Cavazzini C, Corsi AM, Bartali B, Lauretani F, Bardinelli S, Guralnik JM. Biomarkers of frailty in older persons. *J Endocrinol Invest* 25(10):10-15, 2002

Festa A, D'Agostino R Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102(1):42-47, 2000

Festa A, D'Agostino R Jr., Tracy RP, Haffner MS. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:1131-1137, 2002

Freeman JD, Norrie J, Caslake JM, Gaw A, Ford I, Lowe DOG, O'Reilly St.JD, Packard JC, Sattar N, for the West of Scotland Coronary Prevention study Group. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 51:1596-1600, 2002

Frietas JP, Filipe PM, Rodrigo FG. Lipid peroxidation in type 2 normolipidemic diabetic patients. *Diabetes Res clin Pract* 36:71-75, 1997

Fujii A, Abe I, Ohya Y, Onaka U, Tominaga M, Ohmori S et al. Association between hyperinsulinemia and intima-media thickness of the carotid artery in normotensive men. *J Hypertens* 15:167-172, 1997

Furberg CD, Adams HP Jr, Applegate WB, Byington RP, Espeland MA, Hartwell T, Hunninghake DB, Lefkowitz DS, Probstfield J, Riley WA. Effects of lovastatin on early carotid atherosclerosis and cardiovascular events. Asymptomatic Carotid Artery Progression Study (ACAPS) Research Group. *Circulation* 90(4):1679-1687, 1994

Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90:2126-2146, 1994

Gariépy J, Simon A, Massonneau M, Lihart A, Levenson J. Wall thickening of carotid and femoral arteries in male subjects with isolated hypercholesterolemia. PCVMETRA Group. Prevention Cardio-Vascular en Medecine du Travail. *Atherosclerosis* 113(2):141-151, 1995

Gariépy J, Salomon J, Denarie N, Laskri F, Megnien JL, Levenson J, Simon A. Sex and topographic differences in association between large-artery wall thickness and coronary heart risk profile in a French working cohort: the AXA Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(4):584-590, 1998

Gillum RF, Ingram DD, Makuc DM. White blood cell count, coronary heart disease, and death: the NHANES 1 Epidemiologic Follow-up Study. *Am Heart J*. 125:855-863, 1993

Ginwotta C, Morrow JD, Roberts LJ, Kuhn H. Prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds, F<sub>2</sub>-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3236-3241, 1997

Giugliano D, Cereillo A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19(3) :257-267, 1996

Goldschmid MG, Barrett-Connor E, Edelstein SL et al. Dyslipidemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation* 89:991-997, 1994

Gopaul NK, anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF 2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 225-229, 1995

Grundy MS, Howard B, Smith S, Eckel R, Redberg R, Bonow OR. Prevention Conference VI: Diabetes and cardiovascular Disease. Executive summary. *Circulation* 105:2231-2239, 2002

Guillausseau PJ et Lubetzki J. Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *Ann Med Interne* 47:87-92,1996

Hangaishi M, Taguchi J, Miyata T, Ikari Y, Togo M, Hashimoto Y, Watanabe T, Kimura S, Kurokawa K, Ohno M. Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro. *Biochemical & Biophysical Res Communication* 248(2):285-292, 1998

Haverkate F, Thompson SG, Pyké SDM, Gallimore JR, Pepys MB. For the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group :Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *The Lancet* 349:462-466, 1997

Hayden MJ and Reaven DP. Cardiovascular disease in diabetes mellitus 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis: Cell Biology and Lipoproteins* 11:519-528, 2000

Hennekens CH. Coronary disease: risk intervention. In: Julian DG, Wenger NK, editors, *women and heart disease*, 1<sup>st</sup> ed., London: Martin Dunitz 39-48, 1997

Hill JO, Melanson EL. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* 31 (11):S515-521, 1999

Hirano T. Lipoprotein abnormalities in diabetic nephropathy. *Kidney International* 56 (71): S24, 1999

Hulthe J, Wikstrand J, Mattsson-Hulten L, Fagerberg B. Circulating ICAM-1 (intercellular cell-adhesion molecule 1) is associated with early stages of atherosclerosis development and with inflammatory cytokines in healthy 58-year-old men: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study. *Clin Sci (Lond)* 103(2):123-129, 2002

Iacoviello L, Ciccarone E, Donati BM. The genetics of macrovascular disease in diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2:364-368, 2002

Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emies JJ, Yudkin JS, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*. 19(12):3071-3078, 1999

Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emies JJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes. The Hoorn Study. *Diabetes* 49:485-491, 2000

Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510, 1993

Jude EB, Douglas JT, Anderson SG, Young MJ, Boulton AJ. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 13(3):185-189, 2002

Kanters SD, Algra A, Banga JD. Carotid intima-media thickness in hyperlipidemic type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 20(3):276-280, 1997

Kaur J, Singh P, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease. *Am J Ther* 9(6):510-515, 2002

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes 1995-2025: Prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 21(9):1414-1231, 1998

Klein R, Klein B. Vision disorders in diabetes In: Diabetes in America. 2<sup>nd</sup> ed. Harris M, Cowie C, Riber G, Boyko E, Stern M, Bennett P Eds. Washington DC, U. S. Govt. Preinting office 293-338, 1995

Koeing W, Sund M, Frohlich M, Fisher HC, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from MONICA (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99:237, 1999

Krentz AJ, Evans AJ. Insulin resistance and beta-cell dysfunction as therapeutic targets in type 2 diabetes. Review. *Diabetes Obes Metab* 3(4):219-229, 2001

Krolewski AS, Czyzyk A, Kopczynski J, Rywik S. Prevalence of diabetes mellitus, coronary heart disease and hypertension in the families of insulin dependent and insulin independent diabetics. *Diabetologia* 21:520-524, 1981

Kuhn H, Belkner J, Suzuki H, Yamamoto S. Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities. *J Lipid Res* 35:1749, 1994

Laakso M. Cardiovascular disease in Type 2 diabetes :challenge for treatment and prevention, review. *J of Internal Medicine* 249(3):225-235, 2001

Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 263:H257, 1992

Lemieux I, Almeras N, Mauriege P, Blanchet C, Dewwailly E, Bergeron J, Despres JP. Prevalence of « hypertriglyceridemic waist » in men who participated in the Quebec Health Survey: association with atherogenic and diabetologic metabolic risk factors. *Canadian Journal of Cardiology* 18(7):725-732, 2002

Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW, Horton SE, Veves A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* 22(11):1865-1870, 1999

Lip GYH, Blann AD, Zarifis J, Beevers M, Lip PL, Beevers DG. Soluble adhesion molecule P-selectin and endothelial dysfunction in essential hypertension: Implications for atherogenesis? A preliminary report. *J Hypertens.* 13 :1674-1678, 1995

Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 103(7):919-925, 2001

MacMahon S, Sharpe N, Gamble G, Hart H, Scott J, Simes J, White H. Effects of lowering average of below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: results of the LIPID Atherosclerosis Substudy. LIPID Trial Research Group. *Circulation* 97(18):1784-1790, 1998

Magayer MT, Szikszai Z, Balla J, Valikoviks A, Kappelmayer J, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L, Bereczki D. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 34:58-63, 2003

Margitic SE, Bond MD, Crouse JR, Furberg CD, Probstfield JL. Progression and regression of carotid atherosclerosis in clinical trials. *Arterioscler Thromb* 11:443-451, 1991

Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW. Hyperinsulinemia, Hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 283:221-228, 2000

Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, Atlan-Gepner C, Defoort C, Juhel C, Borel P, Portugal H, Pauli AM, Vialettes B, Lairon D. Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:184-191, 1999

Mercuri M, Bond MG, Sirtori CR, Veglia F, Crepaldi G, Feruglio FS, Descovich G, Ricci G, Rubba P, Mancini M, Gallus G, Bianchi G, D'Alo G, Ventura A. Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptomatic hypercholesterolemic mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *American Journal of Medicine* 101(6):627-634, 1996

Milewicz A, Tworowska U, Demissie M. Menopausal obesity-myth or fact?. *Climacteric* 4(4):273-283, 2001

Mitchell BD. Genetic determinants of diabetes and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 4(3):193-198, 2002



Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackeri WE, Awad JA, Roberts LJ. The isoprostanes: Unique prostaglandin like products of free radical initiate lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 31:117-139, 1999

Nakamura Y, Hamazaki T, Kobayashi M, Ohta M, Okuda K. Effects of eicosapentaenoic acids on remnant-like particles, cholesterol concentrations and plasma fatty acid composition in patients with diabetes mellitus. *In vivo* 12:311-314, 1998

Natarajan R, Lanting L, Gonzales N, Nadler J. Formation of an F2-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am J Physiol* 271(1 Pt 2):H159-165, 1996

Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:1676-1685, 1993

Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovas. Res* 27:1184-1190, 1993

Okano HR, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorgawa IS, Kuroda A, Matsuhisa M, Kosugi K, Nishikawa N, Kajimoto Y, Hori M. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25(8):1432-1438, 2002

Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes* 46(12):2096-2101, 1997

Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-1292, 1997

Pigott R, Dillon LP, Hemingway I, Gearing AJH. Soluble forms of E-selectine, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187:584-589, 1992

Pitt B, Byington RP, Furberg CD, Hunninghake DB, Mancini GB, Miller ME, Riley W. Effects of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Circulation* 102(13):1503-1510, 2000

Poli A, Tremoli E, Colombo A, Sirtori M, Pignoli P, Paoletti R. Ultrasonographic measurement of the common carotid artery wall thickness in hypercholesterolemic patients. A new model for quantification and follow-up of preclinical atherosclerosis in living human subjects. *Atherosclerosis* 70(3):253-261, 1988

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286(3):327-334, 2001

Reaven G, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities :the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl Med* 334 :374-381, 1996

Report of who consultation, World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Geneva, 1999

Rexrode KM, Buring J, Manson JE. Abdominal and total adiposity and risk of coronary heart disease in men. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 25(7):1047-1056, 2001

Ribau JC, Hadock SJ, Teoh K, De Reske M, Richardson M. Endothelial adhesion molecule expression is enhanced in the aorta and internal mammary artery of diabetic patients. *J Surg Res* 82:225-233, 1999

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring J, Cook RN. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl Med* 347(20):1557-1565, 2002

Rodriguez JA, Grau A, Eguinoa E, Nespereira B, Perez-Ilzarbe M, Anas R, Belzunce MS, Paramo JA, Martinez-Caro D. Dietary supplementation with vitamin C and E prevents downregulation of endothelial NOS expression in hypercholesterolemia in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 165(1):33-40, 2002

Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM. Circulating cell Adhesion Molecules Are Correlated With Ultrasound-Based Assessment of carotid Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1765-1770, 1998

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol* 57:791-804, 1995

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *The New England Journal of medicine* 340(2):115-126, 1999

Samad F, Yammamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharides. *J Clin Invest* 97:37-46, 1996

Sampson JM, Gopaul N, Davies RI, Hughes AD, Carrier JM. Plasma F2 isoprostanes: Direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25(3):537-541, 2002

Sasaki T, Horiuchi S, Yamazaki M, Yui S. Induction of GM-CSF production of macrophages by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 63(11):2011-2013, 1999

Schneider DJ and Sobel DE. Diabetes and thrombosis: In: Johnstone MT and Veves A, eds. Diabetes and Cardiovascular Disease. Totowa NJ: *Humana Press*, 2001

Schwartz E, Valente A, Spragne A, Kelly J, Nerem R. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 14:1-6, 1991

Seeger H, Wallweiner D, Mueck AO. Lipid-independent effects of an estrogen-statin combination: inhibition of expression of adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 in human endothelial cell cultures. *Climacteric* 4(3):209-214, 2001

Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31:23-37, 1999

Simon A, Gariépy J, Moysé D, Levenson J. Differential effects of nifedipine and co-amilozone on the progression of early carotid wall changes. *Circulation* 103(24):2949-2954, 2001

Simon A, Gariépy J, Chironi G, Megnien JL and Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *Journal of Hypertension* 20:159-169, 2002

Smilde TJ, van Wisse S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 357(9256):577-581, 2001

Staesson J, Amery A, Fargard R. Isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hypertens* 8:393-405, 1990

Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, VanHinsbergh WMV. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* 34:55-68, 1996

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963-20966, 1997

Steven MH, Seppo L, Tapani R, Kalevi P, Markku L. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234, 1998

Stizer M, Markus HS, Mendall MA, Liehr R, Knorr U, Steinmetz H. C-reactive protein and carotid intimal medial thickness in a community population. *J Cardiovasc Risk* 9(2):97-103, 2002

Taniwaki H, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Kanda H, Malkawa K, Nishizawa Y, Morri H. Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:1581-1587, 1999

Temelkova-K TS, Koehler C, Leonhardt W, Schaper F, Henkel E, Seigert G, Hanefeld M. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 22:333-338, 1999

Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, Van de Loo JCW. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction of sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 332:635-641, 1995

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97:22-28, 1996

Trevisan R, Viberti GC. Pathophysiology of diabetic nephropathy. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I, Taylor and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 727-737, 1996

Tschoepe D, Roesen P. Heart disease in diabetes mellitus: a challenge for early diagnosis and intervention. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:16-24, 1998

Tumilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalanien H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Loueranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study Group. *New England Journal of Medicine* 334(18):1343-1350, 2001

UKPDS 2000. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Mathews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *BMJ* 321(7258):405-412, 2000

US Renal Data System. URSDS 1998 Report. Bethesda, MD, National Institute of diabetes and digestive and kidney disease, *National Institutes of Health*, 1998

Usui M, Egashir K. Angiotensin II receptor and oxidative stress. *Nippon Rinsho* 60(10):1893-1897, 2002

Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M. Advanced glycation end products promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1:447-456, 1995

Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. On quantifying plaque size and intima-media thickness in carotid and femoral arteries. Comments on results from a prospective ultrasound study in patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*. 16(7):843-850, 1996

Weyer C, Yudkin JS, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Prately RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. *Atherosclerosis* 161:233-242, 2002

Wick G, Berger P, Jansen-D P, Grunbeck-L B. A Darwinien-evolutionary concept of age-related diseases. *Exp Gerontol* 38(1-2):13-25, 2003

Williams B. Glucose-induced vascular smooth muscle dysfunction: the role of protein kinase C. *J Hypertens* 13:477-486, 1995

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Van Den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-813, 1993

Woodman JR, Watts GF, Puddey IB, Burke V, Mou TA, Hodgson JM, Beilin LJ. Leukocyte count and vascular function in type 2 diabetic subjects with treated hypertension. *Atherosclerosis* 163:175-181, 2002

Woollard KJ, Phillips DC, Griffiths HR. Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 130(2):256-262, 2002

Yamasaki Y, Kawamori R, Matsushima H, Nishizawa H, Kodama M, Kubota M, Kajimoto Y, Kamada T. Asymptomatic hyperglycemia is associated with increased intimal plus medial thickness of the carotid artery. *Diabetologia* 38:585-591, 1995



Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897, 1994

Yip J, Facchini FS, Reaven GM. Resistance to insulin-mediated glucose disposal as a predictor of cardiovascular disease. *J Endocrinol Metab.* 83(8):2773-2776, 1998

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology.* 19(4):972-978, 1999

Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancia G, Dal Palu C, Hansson L, Magnani B, Rahn KH, Reid JL, Rodicio J, Safar M, Eckes L, Rizzini P. European Lacidipine Study on Atherosclerosis investigators. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation* 106(19):2422-2427, 2002

